

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Estudio por métodos espectroscópicos de la interacción de
aminoácidos y homopéptidos con componentes cristalinos de
cálculos renales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Vicente García Ramos

Madrid, 2015

José Vicente García Ramos

TP
1980
095



X-53-004442-X

ESTUDIO POR METODOS ESPECTROSCOPICOS DE LA INTERACCION
DE AMINOACIDOS Y HOMOPÉPTIDOS CON COMPONENTES
CRISTALINOS DE CALCULOS RENALES

Departamento de Espectroscopía
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1980



BIBLIOTECA

© José Vicente García Ramos
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1980
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-19930-1980

JOSE VICENTE GARCIA RAMOS

ESTUDIO POR METODOS ESPECTROSCOPICOS DE LA INTERACCION DE
AMINOACIDOS Y HOMOEPTIDOS CON COMPONENTES CRISTALINOS DE
CALCULOS RENALES.

Director: Pedro Carmona Hernández.

Doctor en Ciencias Químicas.

Colaborador Científico del

Instituto de Optica. C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas.

Departamento de Espectroscopía.

Enero, 1980

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha realizado en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular del Instituto de Optica "Daza de Valdés", del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Debo expresar mi gratitud al Dr. P. Carmona por la dirección de este trabajo y sus continuas orientaciones durante la realización del mismo. Al Dr. A. Hidalgo, Director del Instituto de Optica, por las facilidades encontradas y, sobre todo, por sus valiosas sugerencias e interés.

Al Dr. L. Cifuentes-Delatte de la Fundación "Jimenez Díaz", cuyo entusiasmo y dedicación al tema facilitaron en gran parte la realización de este trabajo. Al Dr. P. F. González-Díaz por sus continuas orientaciones durante la ejecución del mismo. A la Dra. C. de Lozé del "Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman. del C.N.R.S. Thiais (Francia) por las facilidades encontradas en su laboratorio para la realización e interpretación de los espectros IR de las macromoléculas estudiadas.

Quiero expresar también mi gratitud a la Dra. J. Bellanato por sus continuos consejos, sugerencias y dedicación.

Asimismo, debo mi gratitud al Prof. Dr. J. Morcillo, por haber aceptado ser ponente de esta Tesis.

Quiero además expresar mi agradecimiento a los Doctores: C. Ortiz, del Instituto de Optica, por sus orientaciones en el estudio de las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión; J. A. Leal, del Instituto de Inmunología y Biología Microbiana, por permitirnos realizar los análisis de aminoácidos en su Laboratorio, y F. Morales, del Instituto de Cerámica y Vidrio, por el uso del contador de partículas.

Agradezco también a F. López el interés demostrado en la escritura a máquina de esta Tesis.

INDICE

	<u>Pág.</u>
1.- INTRODUCCION. JUSTIFICACION DE ESTE TRABAJO.....	1
2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	4
3.- PARTE EXPERIMENTAL.....	8
3.1.- Muestras estudiadas.....	9
3.1.1.- Cálculos renales.....	9
3.1.2.- Muestras sintéticas.....	9
3.1.2.1.- Hidroxil-apatita no estequiométrica.....	9
3.1.2.2.- Moléculas modelo adsorbidas sobre la hidroxil-apatita.....	10
3.2.- Métodos utilizados para la separación de la fracción orgánica de los cálculos renales.....	11
3.2.1.- Cálculos constituidos fundamentalmente por carbonato-apatita y fosfato amónico magnésico hexahidrato.....	11
3.2.2.- Cálculos constituidos fundamentalmente por oxalato cálcico.....	11
3.2.3.- Cálculos constituidos fundamentalmente por cistina.....	12
3.3.- Método utilizado para la hidrólisis de las proteínas contenidas en la fracción orgánica.....	12
3.4.- Análisis colorimétricos.....	13
3.4.1.- Determinación colorimétrica de aminoácidos y péptidos.....	13
3.4.2.- Determinación colorimétrica del fósforo.....	13
3.5.- Síntesis de la hidroxil-apatita no estequiométrica...	14
3.6.- Calcinación de muestras de apatita.....	14

	<u>Pág</u>
3.7.- Muestras deuteradas.....	14
3.7.1.- N-metil acetamida N-deuterada.....	14
3.7.2.- Acido poli-L-glutámico N-deuterado.....	15
3.7.3.- Poli-L-glutamato cálcico N-deuterado.....	15
3.7.3.1.- Preparación del nitrato cálcico anhidro.....	15
3.7.3.2.- Obtención del poli-L-glutamato cálcico N-deute- rado.....	15
3.7.4.- Apatitas deuteradas.....	16
3.7.4.1.- Preparación de PO_4DNa_2	16
3.7.4.2.- Preparación de apatitas deuteradas.....	16
3.8.- Determinación de los parámetros de la red de la hi- droxil-apatita no estequiométrica.....	16
3.9.- Nucleación de cristales de hidroxil-apatita no este- quiométrica.....	17
3.9.1.- Materiales.....	17
3.9.1.1.- Preparación de las disoluciones de cloruro cálcico y fosfato disódico.....	17
3.9.1.2.- Preparación de las disoluciones de las moléculas modelo.....	17
3.9.2.- Precipitación de la hidroxil-apatita.....	18
3.9.3.- Nucleación de cristales de brushita.....	20
3.9.3.1.- Preparación de las disoluciones de cloruro cálcico y fosfato disódico.....	20
3.9.3.2.- Preparación de las disoluciones de las moléculas modelo.....	20
3.9.3.3.- Precipitación de la brushita.....	21

3.10.- Adsorción de moléculas modelo.....	<u>Pág.</u> 21
3.10.1.- Adsorción de N-metil acetamida.....	22
3.10.2.- Adsorción de aminoácidos.....	23
3.10.3.- Adsorción de péptidos.....	25
3.10.3.1.- Poli-glicina.....	25
3.10.3.2.- Acido Poli-L-aspartico.....	25
3.10.3.3.- Acido Poli-L-glutámico.....	26
3.10.4.- Crecimiento de cristales de hidroxil-apatita no estequiométrica.....	27
3.11.- Técnicas instrumentales.....	28
3.11.1.- Espectroscopía de absorción infrarroja.....	28
3.11.1.1.- Preparación de muestras.....	28
3.11.1.1.1.- Muestras sólidas.....	28
3.11.1.1.2.- Muestras líquidas.....	31
3.11.1.1.3.- Disoluciones.....	31
3.11.1.2.- Análisis cualitativo.....	31
3.11.1.3.- Análisis cuantitativo.....	32
3.11.1.3.1.- Dosificación de los componentes cristalinos de los cálculos.....	35
3.11.2.- Espectroscopía UV y visible.....	40
3.11.3.- Espectroscopía de absorción atómica.....	40
3.11.4.- Difracción de Rayos X.....	41
3.11.5.- Difracción de Rayos X a bajo ángulo.....	41
3.11.6.- Cromatografía de cambio iónico.....	42
3.11.7.- Medida de superficies específicas.....	42
3.11.8.- Medida de agregación de cristales.....	43

3.11.9.- Microscopía electrónica.....	<u>Pág.</u> 45
4.- CALCULOS TEORICOS.....	46
4.1.- Determinación de la conformación más estable del ión aspartato.....	47
4.2.- Conformación de las macromoléculas modelo y cálculo de las distancias interaniónicas.....	47
4.2.1.- Homopéptidos.....	51
4.2.2.- Acido poliacrílico.....	53
5.-RESULTADOS.....	55
5.1.- Análisis de las fracciones orgánicas de cálculos re- nales.....	56
5.2.- Nucleación de hidroxil-apatita no estequiométrica.....	59
5.3.- Adsorción de moléculas modelo.....	65
5.3.1.- N-metil acetamida.....	65
5.3.2.- Acidos L-aspartico y L-glutámico.....	65
5.3.2.1.- Espectros infrarrojos de las muestras calcinadas..	79
5.3.2.2.- Superficies específicas.....	79
5.3.2.3.- Medida de las relaciones Ca/P.....	79
5.3.3.- L-arginina.....	82
5.3.3.1.- Espectro infrarrojo de la muestra calcinada.....	86
5.3.3.2.- Superficies específicas.....	86
5.3.3.3.- Medidas de las relaciones Ca/P.....	86
5.3.4.- Homopéptidos.....	91
5.3.4.1.- Poli-glicina.....	91

5.3.4.2.- Acido poli-L-aspartico.....	<u>Pág.</u> <u>91</u>
5.3.4.3.- Acido poli-L-glutámico.....	94
5.3.5.- Difracción de Rayos X a bajo ángulo.....	103
5.3.6.- Microscopía electrónica.....	104
5.3.7.- Crecimiento de cristales de hidroxil-apatita no es- tequiométrica.....	109
5.3.8.- Agregación de cristales de hidroxil-apatita no es- tequiométrica.....	121
6.- DISCUSION.....	126
6.1.- Mecanismo de la nucleación de la hidroxil-apatita no estequiométrica.....	127
6.1.1.- Influencia de la estructura de las moléculas mode- lo.....	128
6.1.1.1.- Relación entre las distancias interaniónicas de las macromoléculas y las distancias intercati- ónicas de la celdilla unidad de la hidroxil-apa- tita.....	129
6.1.1.2.- Número de partículas y su relación con el meca- nismo de nucleación heterogénea de la hidroxil- apatita.....	136
6.1.1.3.- Influencia de la concentración de las moléculas modelo con respecto a las de calcio y fósforo....	137
6.2.- Crecimiento de cristales de hidroxil-apatita no es- tequiométrica.....	139
6.2.1.- Naturaleza de la interacción de las moléculas mo-	

	<u>Pág.</u>
delo estudiadas con la hidroxil-apatita no este- quiométrica y su conformación en la superficie apatítica.....	141
6.2.1.1.- N-metil acetamida.....	141
6.2.1.2.- Acidos L-aspártico y L-glutámico.....	147
6.2.1.3.- L-arginina.....	155
6.2.1.4.- Poli-glicina.....	157
6.2.1.5.- Acidos poli-L-aspártico y poli-L-glutámico.....	158
6.2.2.- Influencia de la estructura de las macromoléculas estudiadas en el crecimiento de cristales de hidro xil-apatita.....	162
6.3.- Agregación de cristales de hidroxil-apatita no este- quiométrica.....	166
6.4.- Composición química de la fracción orgánica de los cálculos renales y su relación con los componentes cristalinos de aquéllos.....	169
7.- CONCLUSIONES.....	175
8.- BIBLIOGRAFIA.....	181

1.- INTRODUCCION. JUSTIFICACION DE ESTE TRABAJO

La formación de cálculos en el aparato urinario es una de las enfermedades más frecuentes padecidas por el hombre, y a pesar de los estudios realizados sobre este tema, quedan por aclarar numerosas cuestiones relativas a las causas que determinan la formación de aquellos. Acerca del mecanismo de formación de los cálculos, la hipótesis más aceptada supone que en dicho mecanismo transcurren dos fases. Primera mente tiene lugar una fase de nucleación durante la cual se forman microcristales en el medio sobresaturado de la sal precipitable. En segundo lugar, los embriones cristalinos formados crecen y se agregan para formar partículas mayores, que pueden ser retenidas en el aparato urinario.

Uno de los principales problemas en el estudio de la nucleación de las sales componentes de los cálculos se refiere a determinar si esa nucleación es esencialmente homogénea (es decir, si tiene lugar espontáneamente en un medio sobresaturado de dicha sal) o es heterogénea, o sea, si tiene lugar sobre otra fase distinta al componente precipitado o sobre una matriz orgánica. Para ello, lo ideal sería disponer de las fracciones orgánicas de los cálculos y realizar "in vitro" cristalizaciones en presencia de aquellas. Pero el único procedimiento accesible a las citadas fracciones orgánicas (cuya estructura no se conoce) es la desmineralización de los cálculos, con las posibles alteraciones de la estructura que este procedimiento comporta. Por ello, uno de los objetivos de este trabajo ha sido el estudio de la nuclea-

ción de algunos componentes de los cálculos (hidroxil-apatita y brushita) en presencia de algunas moléculas modelo elegidas sobre la base del análisis de aminoácidos de las fracciones orgánicas de cálculos urinarios. Estas sustancias son los ácidos L-aspartico, L-glutámico, poli-L-glutámico y poliacrílico; L-arginina, N-metilacetamida y poli-L-glicina.

Por otra parte, es de sobra conocido que la adición de ciertos compuestos o iones a un medio cristalizante puede tener una considerable influencia en la velocidad de crecimiento de los cristales y sobre su composición. La presencia o ausencia de tales sustancias en la orina puede explicar también la aparición o no de cálculos. Los inhibidores pueden prevenir o disminuir la cristalización por varios procedimientos, principalmente por la formación de complejos solubles estables, y por adsorción sobre ciertas caras de los cristales, causando así una modificación de la morfología de éstos y una alteración de la velocidad de crecimiento cristalino. La determinación del comportamiento que este aspecto tenga la fracción orgánica de la orina viene dificultada por la complejidad de la conformación de las macromoléculas existentes en dicho medio y por la diversidad de los grupos funcionales. Por tanto, parece más apropiado considerar moléculas sencillas con ciertos grupos funcionales y una conformación determinada. Los aminoácidos anteriormente citados pueden existir en la orina bien libres o combinados formando parte de ciertas proteínas. Por consiguiente, otro de los objetivos de este trabajo ha sido estudiar la influen

cia de las sustancias modelo citadas en el crecimiento cristalino de la hidroxil-apatita, no solamente bajo el punto de vista de la naturaleza de los grupos funcionales, sino también de la estructura secundaria. Finalmente, en este trabajo se ha estudiado la agregación cristalina de hidroxil-apatita en presencia de algunas de las moléculas modelo citadas.

2.- ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.

Los primeros trabajos aparecidos en la literatura sobre la composición de la fracción orgánica de los cálculos urinarios y su posible papel como matriz pertenecen a W.H.Boyce y colaboradores (1-5), que encontraron que la fracción orgánica está uniformemente distribuida en todos los cálculos estudiados, constituyendo alrededor del 2,5% del peso de cada cálculo. A partir de estudios histoquímicos (1-4) estos autores indicaron que la fracción orgánica de los cálculos renales es una combinación de mucoproteínas y polisacáridos y que los dos tercios de la citada fracción están formados por material proteico. Identificaron los siguientes monosacáridos manosa, glucosa, fucosa y ramnosa. Finalmente, los citados autores (5) señalaron que las fracciones orgánicas de cálculos de diferente composición cristalina son lo suficientemente similares como para sugerir la existencia de un precursor común, al que llamaron sustancia "A", encontrada por ellos en todos los cálculos estudiados mediante técnicas inmunológicas. Sin embargo, en otro trabajo de la literatura (6) en el que se analizaron los aminoácidos de las fracciones orgánicas de cálculos de diferente composición iónica aparecen notables diferencias en la composición de dichas fracciones.

No se ha llegado a estudiar, por tanto, la composición química de las fracciones orgánicas de los cálculos para intentar establecer una relación entre la composición de dichas fracciones y la composición cristalina de los mismos cálculos. Si esa relación existiese se sugeriría la existencia de algunas macromoléculas que poseen una afinidad específica para un determinado componente cristalino de los cálculos. De ahí que, independientemente de que hayamos analizado los

aminoácidos de ocho cálculos y suministrado así cierta base para elegir las moléculas modelo utilizadas en este trabajo, hayamos in tentado correlacionar en algunos cálculos sus respectivos resulta dos analíticos con los porcentajes en peso de sus componentes cris talinos (hidroxil-apatita y brushita), determinados por espectroscop ia infrarroja mediante un método puesto a punto en nuestro laborato rio.

En lo que respecta a la interacción entre moléculas proteicas y la hidroxil-apatita, Hlady y Füredi-Milhofer (7) han estudiado la adsorción de seroalbúmina humana sobre hidroxil-apatita. La adsorción resultó ser irreversible por dilución, las respectivas isotermas no resultaron ser de tipo Langmuir y la cantidad de proteína adsor bida dependía del pH y de la fuerza iónica. Otros estudios cromato gráficos (8,9) indican que las proteínas de tipo ácido se adsorben de manera selectiva sobre la hidroxil-apatita. Por otra parte, se ha estudiado la adsorción de aminoácidos sobre este fosfato cálcico (10) pero estando aquéllos en disolución a pH 3.3-4.5. Todos estos traba jos carecen de un estudio sobre la naturaleza de la interacción de la hidroxil-apatita con las moléculas adsorbidas sobre este fosfato cálcico y sobre la influencia de esas moléculas en el crecimiento cristalino de la hidroxil-apatita.

Finalmente y en lo que concierne a la agregación cristalina de hidroxil-apatita Hansen y colaboradores (11) han estudiado la agregación de cristales de este fosfato en presencia de ácido hialu

rónico, dermatan sulfato, condroitin 4-sulfato o condroitin 6-sulfato. Estas sustancias resultaron ser inhibidoras de la agregación cristalina de este fosfato de calcio.

3.-PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- Muestras estudiadas.

3.1.1.- Cálculos renales.

En este trabajo se han estudiado catorce cálculos renales proporcionados por el Laboratorio de Urolitiasis de la Fundación Jiménez Díaz. La composición cristalina de estos cálculos se ha deducido con la ayuda de la espectroscopía infrarroja, comparando el espectro del cálculo con el de cada una de las sustancias patrón.

En los catorce cálculos estudiados, la composición cristalina no es la misma, habiéndose encontrado que cinco contienen como principal componente el aminoácido cistina, ocho cálculos están formados fundamentalmente por carbonato-apatita A-B (12), acompañada de fosfato amónico magnésico hexahidratado, que corresponde al mineral estruvita; y contienen además, en algunos casos, oxalato cálcico monohidrato. El cálculo restante está compuesto casi en su totalidad por oxalato cálcico monohidrato.

Asimismo, se han estudiado cuatro cálculos prostáticos cuyo componente mayoritario es la carbonato-apatita A-B.

3.1.2.- Muestras sintéticas.

3.1.2.1.- Hidroxil-apatita no estequiométrica.

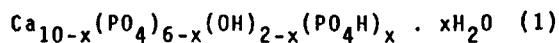
Se ha elegido la hidroxil-apatita no estequiométrica como soporte de los experimentos de adsorción de las distintas moléculas modelo

La estructura cristalina de la hidroxil-apatita ha sido bien establecida (13) y aunque no es muy frecuente en los cálculos renales,

puede considerarse como origen de las carbonato-apatitas que sí lo son

Esta razón, unida al hecho de que el espectro de la hidroxil-apatita no presenta bandas de absorción en la región en que aparecen las mas características de la fracción orgánica, facilita la identificación teniendo en cuenta que dicha fracción es un componente minoritario, del 3 al 6%.

La fórmula general de la hidroxil-apatita no estequiométrica fué establecida por Berry (13) como:



donde el parámetro "x", que se llama grado de deficiencia, puede variar entre cero y dos.

3.1.2.2.- Moléculas modelo adsorbidas sobre la hidroxil-apatita.

Del análisis de la fracción orgánica de los cálculos renales se han obtenido unos resultados, que se describen más adelante, sobre la base de los cuales hemos elegido, por una parte, los ácidos L-aspartico, L-glutámico, poli-L-aspartico y poli-L-glutámico como portadores del grupo carboxilo y de unas estructuras secundarias periódicas que pueden explicar algunos fenómenos que se describen posteriormente; por otra parte, hemos elegido la N-metil acetamida y poli-glicina como moléculas portadoras del grupo peptídico. Finalmente, hemos utilizado L-arginina como aminoácido de carácter básico.

Excepto la N-metil acetamida, todas las demás sustancias han sido suministradas por la firma Sigma Chemical Co. La N-metil acetamida se ha sintetizado por el procedimiento de Hofmann (14) purificándola

la por destilación de vacío (p.f. 28°C) repetidas veces.

3.2.- Métodos utilizados para la separación de la fracción orgánica de los cálculos renales.

Todos los métodos utilizados para separar la fracción orgánica de los cálculos renales se basan en disolver la parte cristalina de los mismos, procurando, en lo posible, dejar intacta la fracción orgánica. La desmineralización se ha controlado por espectroscopía infrarroja.

3.2.1.- Cálculos constituidos fundamentalmente por carbonato-apatita y fosfato amónico magnésico hexahidrato.

El método seguido (14) se basa en someter el cálculo a una disolución acuosa que contiene ácido nítrico al 5% y formaldehído al 15%. La desmineralización se hace patente por la menor densidad de la fracción orgánica separada. Debido a la posible degradación de parte de la materia orgánica por el ácido, se sustituyó el ácido nítrico por un agente quelatante como el EDTA (etilen diamina tetraacético) a pH 8, (1) el cual actúa de forma excesivamente lenta y por ello, teniendo en cuenta que los resultados fueron idénticos, se ha empleado el ácido nítrico.

3.2.2.- Cálculos constituidos fundamentalmente por oxalato cálcico.

La eliminación de la parte cristalina en este tipo de cálculos, se ha llevado a cabo con EDTA (1) al 5% y formaldehído al

15%, ajustando el pH a 8 y manteniéndolo en frío durante un tiempo que oscila entre 10 y 40 semanas.

3.2.3.- Cálculos constituidos fundamentalmente por cistina.

La cistina ha sido eliminada tratando los cálculos con una solución acuosa de NaOH ajustada a un pH=8 durante 50 semanas. A esta solución se le añaden unas gotas de formaldehído, para evitar la desnaturalización de la proteína.

El pH se mantiene alrededor de 8 durante todo el proceso por adición de NaOH.

3.3.- Método utilizado para la hidrólisis de las proteínas contenidas en la fracción orgánica.

Una vez separada la fracción orgánica, se pesan unos 6 mg de la misma, se colocan en un tubo Thunberg; se añade 1 ml de ClH 6N, dejándolo en el frigorífico durante 10 minutos. A continuación, se coloca el tubo en un baño de hielo y se le hace el vacío durante 2 minutos. La muestra se somete entonces a 110°C durante 24 horas; al cabo de este tiempo, se coloca en un recipiente abierto dentro de un desecador a vacío con lentejas de NaOH con el fin de eliminar el ClH. Después de 24 horas, se lleva a un volumen de unos 6 ml con ClH 0.01N, ajustando el pH a 2 con NaOH 0.01N. Si el hidrolizado presenta partículas en suspensión, se filtra antes de someterlo a análisis por cromatografía de cambio iónico.

3.4.- Análisis colorimétricos

3.4.1.- Determinación colorimétrica de aminoácidos y péptidos.

Se ha seguido el método de Stein y Spies (16), (17) que consiste en tratar 0.1 ml de aminoácido ó péptido hidrolizado con 1 ml de una disolución de ninhidrina en metil cellosolve añadida sobre otra de cloruro estannoso en tampón citrato (pH=5). El tubo se calienta durante 20 minutos en un baño de agua hirviendo. A continuación, se añaden 5 ml de propanol:agua (1:1; v/v) a cada tubo, se agita y después de 15 minutos se lee la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro UV.

La concentración en aminoácidos se determina mediante una curva standard con muestras de aminoácidos patrón.

3.4.2.- Determinación colorimétrica del fósforo

El fósforo en forma de anión fosfato, se ha determinado por el método de Fiske y Subbarow (18), que consiste en combinar el fósforo que contiene el medio como anión fosfato con el ácido molibdico en presencia de sulfúrico. El fosfomolibdato obtenido se reduce con ácido 1,2,4 amino naftosulfónico, midiendo la transmitancia del complejo azul a 700 nm.

La concentración de fósforo se determina mediante una curva

va standard con muestras de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$.

3.5.- Síntesis de la hidroxil-apatita no estequiométrica.

La hidroxil-apatita no estequiométrica se ha sintetizado siguiendo el método de Winand (19) modificado por González-Díaz (20).

Se añade gota a gota una disolución de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que contiene 3.6 g en 100 ml de agua sobre otra de 6.8 g de $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 300 ml. El pH se ajusta a 8 con NH_4OH a lo largo de todo el proceso.

La suspensión así obtenida se filtra a vacío; el precipitado se lava con 100 ml de agua hirviendo y se seca en estufa a 60°C .

3.6.- Calcinación de muestras de apatita.

Con objeto de determinar si hay sustitución de iones negativos en la apatita por iones aspartato o glutamato, y para calcular los parámetros de la red apatítica, se han calentado en un horno a 800°C y durante 2 horas varias muestras de apatita introducidas en crisoles de porcelana.

3.7.- Muestras deuteradas:

3.7.1.- N-Metilacetamida N-deuterada.

La deuteración de esta sustancia se ha realizado mediante intercambio isotópico con agua pesada y secado a vacío en presencia de P_2O_5 . La operación se ha repetido tres veces en una caja de guantes hasta comprobar por espectroscopía infrarroja (regiones $2600\text{-}2000$ y $1600\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$) que la sustancia fue deuterada en una proporción mayor del 98%.

3.7.2.-Acido poli-L-glútamico N-deuterado.

Esta sustancia adquirida en forma de sal sódica (peso molecular comprendido entre 50000 y 100000) se ha ajustado a pH 8 con NaOH 0.1N en disolución acuosa para evitar una posible hidrólisis del polímero. Posteriormente la solución se secó a vacio en presencia de P_2O_5 y después se añadieron unos mililitros de D_2O . La solución se dejó en una caja de guantes durante 1 h. Alternativamente se secó en vacio y se añadieron unos mililitros de D_2O hasta comprobar, por espectroscopia infrarroja, una deuteración mayor del 98%.

3.7.3.-Poli-L-glutamato cálcico N-deuterado.

3.7.3.1.-Preparación del nitrato cálcico anhidro.

Se han calentado varios gramos de $(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$ en estufa, a $150^\circ C$, durante seis horas, hasta comprobar, por espectroscopia infrarroja la pérdida del agua de cristalización. El espectro resultante coincide con el publicado en la literatura (21).

3.7.3.2.-Obtención del poli-L-glutamato cálcico N-deuterado.

Se ha seguido el método indicado en la literatura (22), (23), (24). A una solución de 10 ml de agua pesada conteniendo 100 mg de poli-L-glutamato de sodio deuterado se han añadido 5 ml de otra solución en agua pesada conteniendo 0,0542 g de $(NO_3)_2Ca$ anhidro. La solución resultante se ha calentado a $60^\circ C$ durante dos horas en un recipiente cerrado. El precipitado obtenido se ha filtrado y secado en un desecador a vacio en presencia de P_2O_5 . Su espectro infrarrojo coincide con el publicado en la literatura (23). La preparación de este producto N-deuterado se ha realizado en caja de guantes.

3.7.4.-Apatitas deuteradas.

Para la obtención de estos productos se ha procedido previamente a preparar PO_4DNa_2 .

3.7.4.1.-Preparación de PO_4DNa_2 .

Se han calentado a $80-85^\circ \text{C}$, durante tres horas, 0.5 g de $\text{PO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Se ha obtenido entonces PO_4HNa_2 anhidro. A continuación, se disuelve en varios mililitros de D_2O secándolo a vacío en presencia de P_2O_5 . Se añaden nuevamente unos mililitros de D_2O y se seca la solución, operaciones que se repiten varias veces en la caja de guantes hasta comprobar, por espectroscopía infrarroja, la total deuteración del producto. Su espectro infrarrojo resultó coincidir con el de la bibliografía (26).

3.7.4.2.-Preparación de apatitas deuteradas.

Se han disuelto 0.120 g de PO_4DNa_2 en 5 ml de D_2O . Igualmente se han disuelto 0.295 mg de $(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$ anhidro (ó cantidad equivalente de $(\text{NO}_3)_2\text{Sr}$ ó $(\text{NO}_3)_2\text{Ba}$) en 5 ml de D_2O . Los pD de ambas disoluciones se han ajustado a 10 con NaOD 0.1N. Posteriormente, se añade la primera solución gota a gota sobre la segunda, procurando mantener a 10 el pD del medio durante la adición. El precipitado resultante se filtra y se lava con unos mililitros de D_2O , secándolo a vacío en presencia de P_2O_5 .

3.8.-Determinación de los parámetros de la red de la hidroxil-apatita no estequiométrica.

Al ser la hidroxil-apatita de los cálculos un compuesto no

estequiométrico, las dimensiones de su celdilla unidad varían según su grado de deficiencia. En todos los casos, la hidroxil-apatita cristaliza en el sistema hexagonal, por lo que sus parámetros cristalográficos son $a=b \neq c$.

Con la ayuda de la difracción de Rayos X y la espectroscopía de absorción infrarroja, se han calculado las dimensiones de la celdilla unidad de las apatitas cálcicas sintetizadas por nosotros siguiendo el método desarrollado por P.F. González-Díaz y M. Santos (12), (27).

3.9.- Nucleación de cristales de hidroxil-apatita no estequiométrica.

3.9.1.- Materiales.

3.9.1.1.- Preparación de las disoluciones de cloruro cálcico y fosfato disódico.

a) Cloruro cálcico.- Se pesaron 340 mg de $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sobre los que se añadió agua destilada hasta un volumen final de 50 ml, ajustando luego el pH a 10 con hidróxido amónico.

b) Fosfato disódico.- Se pesaron 232 mg de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se añadió agua destilada hasta un volumen de 50 ml. El pH de la disolución resultante se ajustó a 10 con hidróxido amónico.

3.9.1.2.- Preparación de las disoluciones de las moléculas modelo.

a) Ácido L-glutámico.- Se pesaron 19.47 mg de ácido L-glutámico y se llevaron a un vaso de precipitados sobre el que se añadieron 7 ml de agua destilada. El pH de la disolución se ajustó a 7.5 con hidróxido sódico. El volumen final se llevó a 10 ml en un matraz aforado.

b) Acido poli-L-glutámico. - Se pesaron 20 mg de esta sustancia y se añadieron 7 ml de agua destilada. El pH de la disolución se ajustó a 7.5 con hidróxido sódico, completando el volumen final de la misma a 10 ml, con agua destilada, en un matraz aforado.

c) Acido poliacrílico. - Este producto se ha obtenido partiendo del ácido acrílico comercial de la firma Merck purificado mediante destilación a vacío en atmósfera de nitrógeno. Se polimerizaron radicalmente unos 20 ml del monómero en un matraz con 0.6 g de persulfato sódico, 0.18 g de sulfito sódico y 300 ml de agua destilada. La mezcla se calentó durante 4 horas a 60° C. El disolvente se extrajo destilando a vacío; el polímero se disolvió en 1 litro de metanol, precipitándolo a continuación con éter etílico en la proporción 1:10. Esta operación se repitió varias veces. El metanol residual del precipitado, se eliminó secándolo a vacío. La identidad se verificó mediante su espectro de absorción IR (24).

La disolución del ácido poliacrílico se preparó del siguiente modo: la muestra obtenida por nosotros existe inicialmente en forma ácida. De ésta, se pesaron 23.85 mg. que se introdujeron en un vaso de precipitado y se añadieron 20 ml de agua destilada. El pH de la disolución se ajustó a 7.5 y se enrasó a 25 ml en un matraz aforado.

3.9.2.- Precipitación de la hidroxil-apatita

Hemos precipitado hidroxil-apatita no estequiométrica, partiendo de diferentes concentraciones de reactivo.

a) Se tomaron 2 ml de la disolución de calcio y otros 2 ml

de la de fosfato y cada uno de estos volúmenes se enrasó a 25 ml con una disolución de hidróxido amónico a pH 10. Se vertió la disolución de fosfato sobre la de calcio y tras un minuto de agitación se midió la transmitancia a 550 nm, utilizando cubetas de vidrio de 1 cm de camino óptico. Esta medida se realizó cada minuto durante media hora.

Tras la mezcla de las disoluciones reactivas, la concentración de cloruro cálcico fué 0.092 mM, y la de fosfato disódico 0.052 mM. Por espectroscopia IR se verificó que el precipitado obtenido corresponde a hidroxil-apatita no estequiométrica.

b) Se realizó esta misma precipitación, según el método que se acaba de describir, pero partiendo de 4 ml de cada solución de cloruro cálcico y fosfato disódico, y completando cada uno de estos volúmenes hasta 25 ml con la disolución de hidróxido amónico (pH=10).

c) Finalmente, se realizaron precipitaciones de apatita partiendo de las concentraciones de calcio y fosfato indicadas en los apartados a) y b), pero añadiendo a la disolución de fosfato 2 ml de la disolución de los ácidos L-glutámico, poli-L-glutámico o poliacrílico y completando, como siempre hasta un volumen de 25 ml con la disolución de NH_4OH (pH=10). Después de mezclar las disoluciones reactivas, las concentraciones de estas sustancias orgánicas fueron de $5.3 \cdot 10^{-4} \text{ N}$.

La reproducibilidad de estas precipitaciones fué del 0.3% de transmitancia

d) Asimismo, se realizó un experimento de precipitación, par

tiendo de las concentraciones indicadas en el apartado a), incluyendo en la disolución reactiva de fosfato disódico, 1 y 2 ml de disolución de ácido poli-L-glutámico. Ambas precipitaciones se han realizado con objeto de determinar mediante el Coulter Counter (Sección 3.11.8.-) la distribución media de los diámetros de las partículas de apatita precipitada y la dependencia de éstos con la concentración de ácido poli-L-glutámico.

3.9.3.- Nucleación de cristales de brushita.

Como término de comparación, hemos precipitado brushita, $\text{PO}_4\text{HCa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, para determinar la diferencia de comportamiento entre las moléculas modelo consideradas al pasar de una estructura cristalina a otra cuyas distancias intercatiónicas fueran diferentes.

3.9.3.1.- Preparación de las disoluciones de cloruro cálcico y fosfato disódico.

a) Cloruro cálcico.- Se pesaron 2.040 mg de $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sobre los que se añadió agua destilada hasta un volumen final de 50 ml, ajustando luego el pH a 5.8 con ClH 0.1 N.

b) Fosfato disódico.- Se pesaron 1.392 g de $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y se añadió agua destilada hasta un volumen final de 50 ml. El pH de la disolución resultante se ajustó a 6.0 con ClH 0.1 N.

3.9.3.2.- Preparación de las disoluciones de moléculas modelo.

Para la nucleación de brushita hemos utilizado, como moléculas modelo, las disoluciones preparadas en la sección 3.9.1.2.

3.9.3.3.- Precipitación de la brushita.

a) Se tomaron 6 ml de la disolución de calcio y otros 6 ml de la de fosfato; y cada uno de estos volúmenes se enrasó a 25 ml con una disolución acuosa de ClH a pH 5.5. Se vertió la disolución de fosfato sobre la de calcio y tras un minuto de agitación se midió la transmitancia a 550 mμ, de acuerdo con el método indicado en la sección

Tras la mezcla de las disoluciones reactivas, la concentración de cloruro cálcico fue 0.552mM y la de fosfato disódico 0.312mM

Por espectroscopía IR se verificó que el precipitado obtenido corresponde a brushita.

b) Se realizó esta misma precipitación según el método que se acaba de describir, pero añadiendo en cada caso 2 ml de cada una de las disoluciones de moléculas modelo, a la disolución de fosfato disódico.

3.10.- Adsorción de moléculas modelo.

Con el fin de estudiar la interacción de la fracción orgánica de los cálculos renales con la hidroxil-apatita no estequiométrica se han elegido una serie de moléculas modelo relacionadas con los principales componentes de dichas fracciones orgánicas.

Cuando la adsorción de moléculas se estudia en la interfase líquido-sólido, pueden aparecer dos problemas. En principio, y pues

to que las moléculas estudiadas en estos sistemas son mayores que las de cualquier interfase gas-sólido, puede producirse un fenómeno de capas múltiples cuando se trabaja con altas concentraciones de adsorbato. En tales casos, no se podría distinguir la primera capa, que es la que interacciona con el sustrato, en este caso la apatita, de las siguientes. Por otro lado, la adsorción del disolvente podría competir con el adsorbato; si esto ocurriera, habría que excluir aquellas regiones del espectro en las cuales la absorción del disolvente fuera intensa.

En el presente trabajo, se ha procurado que la proporción de moléculas adsorbidas respecto al sustrato fuera tal que quedara todavía lejos de completar una monocapa. Además, no ha habido ningún problema con la retención de los disolventes empleados, por el sólido.

3.10.1.- Adsorción de N-metil acetamida.

Debido al porcentaje realmente importante de proteínas que aparecen en las fracciones orgánicas de los cálculos renales, parece interesante comenzar estudiando si el enlace peptídico, $-CO-NH-$, juega algún papel en la interacción de estas fracciones orgánicas con el fosfato cálcico apatítico.

Como modelo se ha elegido la N-metil acetamida, $CH_3-CO-NH-CH_3$, que es la molécula más sencilla que contiene un enlace peptídico, pudiendose considerar como unidad estructural de una cadena polipeptfídica.

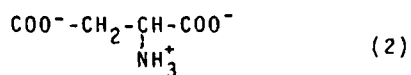
Los espectros de absorción infrarroja de esta amida son idénticos a los que aparecen en la literatura (24).

La experiencia de adsorción de esta sustancia sobre la hidroxil-apatita se ha realizado como sigue: En una caja de guantes, se muelen en un mortero de ágata unos 30 mg de hidroxil-apatita no estequiométrica deuterada, a la que posteriormente se añade 0.5 ml de D₂O. Esta suspensión se dispersa después en el mortero durante unos segundos. A continuación, se cogen con una pipeta varias gotas de dicha suspensión y se depositan sobre un cristal de F₂Ca que ha de servir de ventana para una célula de infrarrojo. El cristal se coloca sobre un desecador que contiene P₂O₅ y se realiza posteriormente el vacío.

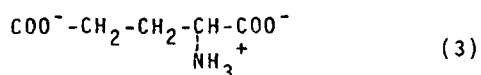
En la célula especial que se describe mas adelante (Sección 3.11.1.) se introduce 1 ml de N-metil acetamida N-deuterada y se registra el espectro infrarrojo cada hora.

3.10.2.- Adsorción de aminoácidos.

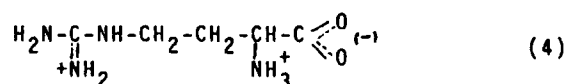
Para estudiar la interacción entre la hidroxil-apatita y los aminoácidos, se han elegido como modelos el ácido L-aspártico:



y el ácido L-glutámico:



por ser los más abundantes en las fracciones orgánicas estudiadas. También se ha considerado la L-arginina, que, como se sabe posee un grupo funcional básico:



En los tres casos se ha realizado la experiencia de la siguiente forma: se preparan 300 ml de una disolución acuosa que contiene 10 milimoles de aminoácido y 45 milimoles de Cl_2Ca sobre la que se añaden gota a gota 100 ml de otra disolución que contiene 38 milimoles de PO_4HNa_2 . El pH de las dos disoluciones se ajusta, durante todo el proceso, a un valor cercano a 8 con NH_4OH . La suspensión así formada, se filtra a vacío, (se lava con 100 ml de agua hirviendo para eliminar el NH_3) y se seca en estufa a 60°C .

La temperatura a la cual se realiza la precipitación es de 37°C . Se ha elegido esta temperatura con objeto de aproximarse a la del cuerpo humano. Asimismo, el pH se ha elegido con el fin de que los grupos carboxílicos de los aminoácidos estén en forma disociada que es como se encuentran en un medio fisiológico.

Las isotermas de adsorción de los tres aminoácidos se han obtenido colocando distintas muestras pesadas de hidroxil-apatita (100 a 400 mg) en tubos con 2 ml de disolución de los aminoácidos en agua (pH=10) a distintas concentraciones (0.10-4.5 $\mu\text{m}/\text{ml}$). Los tubos se han mantenido durante una hora dentro de un baño a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$, agitando cada cinco minutos. A continuación, se han centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos, tomando partes alícuotas de los sobrena

dantes para los análisis colorimétricos.

Las cantidades adsorbidas se han obtenido como diferencia entre las concentraciones inicial y final de aminoácido. La presentación de la cantidad adsorbida por gramo de apatita, Q , frente a las concentraciones finales de adsorbato, C , constituye la isoterma de adsorción del compuesto en cuestión.

3.10.3.- Adsorción de péptidos.

A partir de los resultados obtenidos con los aminoácidos, se ha estudiado la interacción de la hidroxil-apatita deficiente con tres homopéptidos comerciales: poli-glicina, ácido poli-L-aspártico y ácido poli-L-glutámico.

3.10.3.1.- Poli-glicina

La adsorción se ha llevado a cabo añadiendo 5 mg de hidroxil-apatita no estequiométrica a una disolución de 2 mg de poli-glicina disuelta en 5 ml de una disolución saturada de BrLi. La suspensión se somete a ultrasonido y al cabo de 24 horas se decanta, lavándola repetidas veces con volúmenes de agua destilada de 5 ml. A continuación se filtra y se seca.

3.10.3.2.- Acido Poli-L-aspártico.

La adsorción se ha llevado a cabo de la siguiente forma:

Se prepara una suspensión de 10 mg de apatita en 5 ml de agua, ajustando el pH a 8 con NH_4OH , y sometiendo a ultrasonido durante media hora. A continuación se añaden 0.5 ml de una disolución al 2%.

en peso del polímero en agua cuyo pH se ha llevado también a un valor cercano a 8 con NH_4OH . La suspensión se mantiene a 37°C durante 24 horas, se filtra y se seca.

3.10.3.3.- Acido Poli-L-glutámico.

En un tubo de vidrio de 0.3 x 7 cm, se han introducido 10 mg de apatita cálcica deuterada y, a continuación, 0.3 ml de solución de agua pesada conteniendo 15 mg de poli-L-glutamato sódico deuterado. Esta operación se ha realizado en una bolsa de guantes que previamente había sido preparada haciendo el vacío e introduciendo argón alternativamente cinco veces. Una vez preparada la suspensión en el tubo, se introduce éste en una caja de guantes y se agita de vez en cuando durante cinco horas. Se deja decantar y la solución restante de polímero se separa con la ayuda de una pipeta. La muestra de apatita se seca al vacío en presencia de P_2O_5 . A continuación se muele la apatita en un mortero de ágata, dentro de la bolsa de guantes, y se le añaden varias gotas de D_2O . Seguidamente, y con ayuda de una pipeta, se colocan unas gotas de la suspensión resultante sobre un cristal de fluoruro cálcico que está situado en un pesasustancias cerrado. Este se introduce después en un desecador colocado en una caja de guantes, haciendo el vacío en presencia de P_2O_5 . El cristal, una vez seco, se coloca en la célula especial, indicada en la sección 3.11.1., con el fin de registrar el espectro infrarrojo.

Esta experiencia de adsorción se ha realizado dos veces, utilizando en la última una solución de polímero cuya concentración era la mitad de la citada más arriba. En los dos casos se han obtenido bandas de absorción infrarroja apreciables.

3.10.4.- Crecimiento de cristales de hidroxil-apatita no estequiométrica.

Se han introducido en vasos de precipitado de 100 ml, 351 mg de ClNa, 2 mg de hidroxil-apatita no estequiométrica y posteriormente $1.37 \cdot 10^{-5}$ moles de diferentes moléculas modelo $1.37 \cdot 10^{-5}$ equivalentes en el caso de las macromoléculas utilizadas) y $4.18 \cdot 10^{-5}$ moles de PO_4HNa_2 disueltos en 25.5 ml de agua. El pH de las disoluciones se ajustó previamente a 9 con NaOH 0.1 N. A continuación se añadieron 24.5 ml de una solución de cloruro cálcico conteniendo $8.45 \cdot 10^{-5}$ moles. Las soluciones resultantes se agitaron cada hora, separando 5 ml de sobrenadante antes de cada agitación. Los volúmenes así obtenidos se filtraron y se sometieron a determinación cuantitativa de Ca^{++} por espectroscopia de absorción atómica.

Las moléculas modelo ensayadas han sido: ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, L-arginina, N-metil acetamida, ácido poli-L-glutámico y ácido poliacrílico.

El crecimiento de cristales de brushita se ha realizado mezclando por un lado, 2 mls de una disolución de PO_4HNa_2 $2.6 \cdot 10^{-4}$ M (pH=6) con 2 mg de brushita, que se enrasan a 25 ml con una disolución de ácido clorhídrico ajustada a pH 6. Para ensayar las moléculas modelo, se añaden $1.37 \cdot 10^{-5}$ equivalentes de estas sustancias antes de enrasar a 25 ml. Por otra parte se preparó otra disolución reactiva que contiene $5.5 \cdot 10^{-4}$ moles de Cl_2Ca en 25 ml de solución clorhídrica ajustada a pH 6.

Los ensayos de crecimiento se han realizado añadiendo la di solución de cloruro cálcico sobre la de fosfato disódico, recogiendo muestras alicuotas cada hora, que se someten a análisis por espectros copia de absorción atómica.

Tanto en el caso de la hidroxil-apatita como en el de la brushita, si se realiza el ensayo sin añadir el sólido preformado, no aparece precipitado durante el tiempo en que se han tomado las partes alicuotas para el análisis de calcio por absorción atómica.

3.11.- Técnicas instrumentales.

3.11.1.- Espectroscopía de absorción infrarroja.

Todos los espectros de absorción infrarroja que figuran en este trabajo se han obtenido en espectrofotómetros Perkin-Elmer, mode los 457, 225 y 599 entre 4000 y 250 cm^{-1} .

3.11.1.1.- Preparación de muestras.

3.11.1.1.1.- Muestras sólidas.

En el caso de muestras sólidas, se ha seguido la técnica de los comprimidos de BrK, dispersando unos 3 mg de muestra en 300 mg de bromuro potásico seco a 400°C. Cuando la muestra interacciona con el bromuro potásico se prepara una suspensión de la misma en nujol, excepto para el caso de la hidroxil-apatita conteniendo poli-L-glicí na adsorbida, que debido a la pequeña solubilidad de esta última en agua no permite obtener considerables cantidades de la misma adsorbi das sobre apatita como requiere la técnica del nujol. En este caso se

ha recurrido a obtener un film policristalino sobre una ventana de F_2Ca , partiendo de una gota de suspensión secada a vacío en presencia de P_2O_5 .

Los espectros infrarrojos correspondientes al poli-L-glutamato sódico N-deuterado se han registrado haciendo uso de una célula especial (figura 1). esta célula consta de unos soportes metálicos usuales entre los que se coloca una cámara de vidrio a cuyas caras ópticas están adheridos, mediante parafina, dos cristales de F_2Ca ó $ClAg$. El camino óptico de la cámara es 2 cm y su parte inferior comunica con un pequeño recipiente de paredes interiores esmeriladas. Este recipiente, permite mantener cerrada la cámara y en él se deposita el P_2O_5 ó solución saturada cuya humedad relativa queremos obtener. La preparación de las muestras se ha realizado como sigue. Sobre un cristal de F_2Ca ó $ClAg$ se han depositado varias gotas de solución de polímero en D_2O conteniendo 33 mg/ml, y a continuación se seca a vacío en presencia de P_2O_5 . La preparación de estas muestras se ha realizado en caja de guantes. Para controlar la humedad relativa en contacto con la muestra, se han utilizado soluciones saturadas de sustancias patrón (28) (P_2O_5 : 0%, $(NO_3)_2Ca$: 51%, BrK: 84%).

Los espectros infrarrojos de apatita conteniendo el polímero adsorbido se han obtenido asimismo mediante el uso de la célula especial. Las muestras se preparan como se ha indicado en la sección 3. 10.3.3. y se ha controlado la humedad relativa de la célula mediante el uso de las soluciones saturadas indicadas anteriormente.

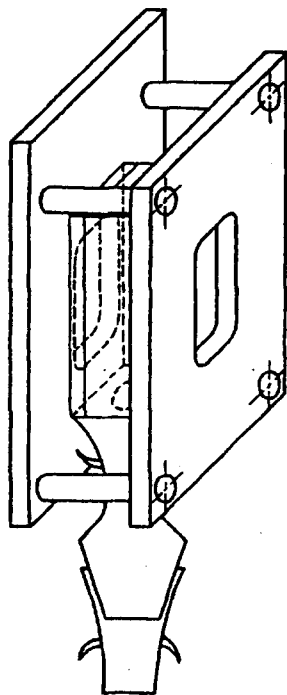


Fig. 1 .- Célula utilizada para el registro de los espectros IR a diferentes humedades relativas.

3.11.1.1.2.- Muestras líquidas.

Para el registro de los espectros de las muestras líquidas, se han preparado films entre dos cristales de ClNa .

3.11.1.1.3.- Disoluciones

a) En agua deuterada. los espectros de las sustancias estudiadas en disolución en D_2O del 99.99% se han registrado en células de 0.1 mm de espesor con ventanas de F_2Ca .

b) En tetracloruro de carbono. El Cl_4C que se ha utilizado para preparar estas disoluciones es de la firma Merck, p.a. Las células usadas han sido de 0.2 y 1 mm de espesor con ventanas de ClNa , colocando una célula de espesor variable con disolvente en el haz de referencia, y ajustando su espesor para compensar la absorción del disolvente.

También se han utilizado cubetas de 1 cm de espesor con ventanas de cuarzo, para el caso de disoluciones muy diluidas.

3.11.1.2.- Análisis cualitativo

Una de las principales aplicaciones de la espectroscopía IR es la determinación cualitativa de los componentes de una mezcla.

En este trabajo, se ha diagnosticado la composición de los cálculos estudiados, así como la de sus respectivas fracciones orgánicas, comparando los espectros de absorción infrarroja de las muestras con los que aparecen en la literatura o con los de las sustan-

cias sintetizadas por nosotros.

En las figuras 2 a 5 se presentan los espectros de absorción IR de los distintos tipos de cálculos renales estudiados.

3.11.1.3.- Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo por espectroscopía de absorción infrarroja se funda en la medida de las intensidades de ciertas bandas clave.

El cálculo de la concentración se realiza utilizando la ley de Lambert-Beer;

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (5)$$

donde A es la absorbancia, también llamada densidad óptica; I₀ e I son las intensidades de la radiación monocromática incidente y transmitida, l es el espesor de la célula de absorción en centímetros; c es la concentración en moles/litro del componente a analizar y ε es el coeficiente de extinción molar. Representando los valores de las absorbancias de la banda clave elegida frente a las concentraciones se obtendrá, si se cumple la ley de Lambert-Beer, una recta cuya pendiente es ε.l.

Para la medida de I₀ y de I se ha utilizado el método de las líneas de base de Wright (29), tomando como línea de base la horizontal trazada en el punto de máxima transmisión a uno de los lados de la banda clave.

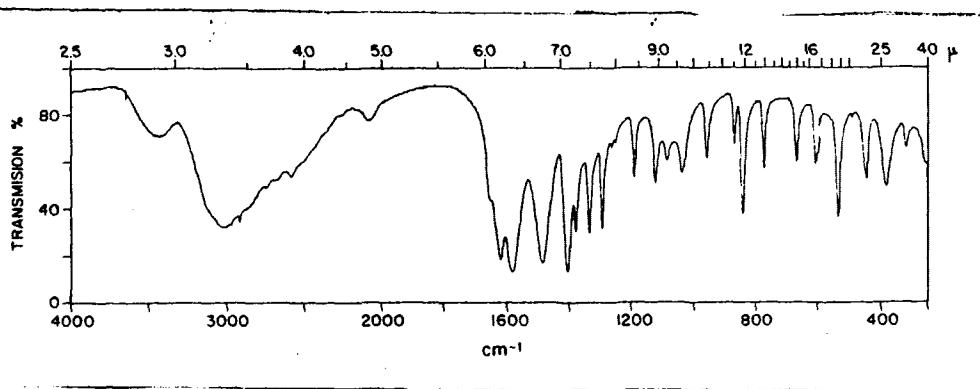


Fig. 2 .- Espectro IR de un cálculo renal conteniendo principalmente cistina.

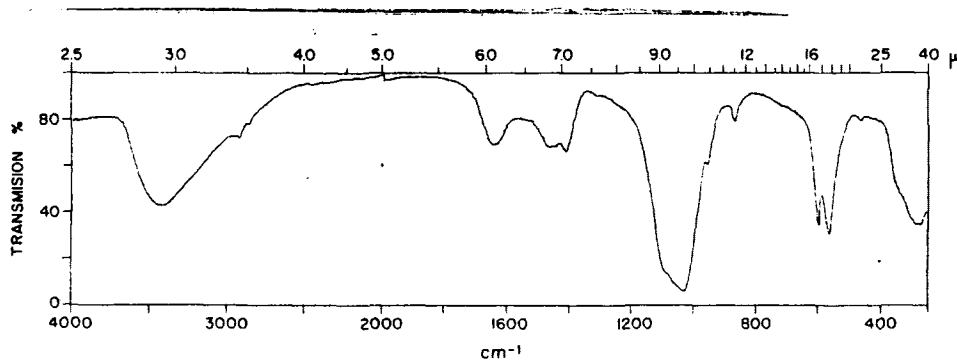


Fig. 3 .- Espectro IR de un cálculo renal conteniendo principalmente carbonato-apatita.

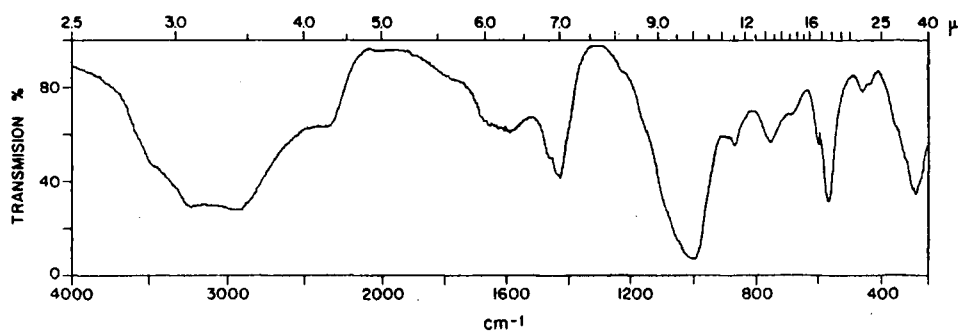


Fig. 4 .- Espectro IR de un cálculo renal conteniendo principalmente estruvita y carbonato-apatita.

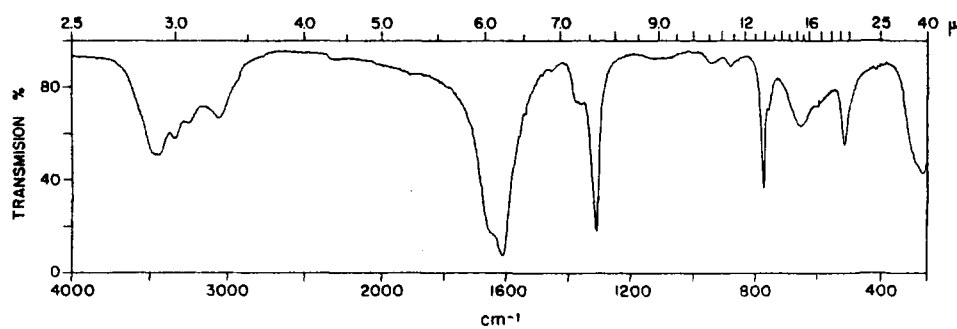


Fig. 5 .- Espectro IR de un cálculo renal conteniendo principalmente oxalato cálcico monohidrato.

Las curvas de calibrado se obtienen representando los valores de las absorbancias frente al producto de las concentraciones por los pesos respectivos de los comprimidos.

A los puntos experimentales obtenidos por mínimos cuadrados se han ajustado ecuaciones de la forma $y=mx+n$ mediante las expresiones:

$$m = \frac{p \cdot \Sigma(x \cdot y) - \Sigma(x) \cdot \Sigma(y)}{p \cdot \Sigma(x^2) - \Sigma(x) \cdot \Sigma(x)} \quad (6)$$

$$n = \frac{\Sigma(y) \cdot \Sigma(x^2) - \Sigma(x) \cdot \Sigma(x \cdot y)}{p \cdot \Sigma(x^2) - \Sigma(x) \cdot \Sigma(x)} \quad (7)$$

donde m es la pendiente de la recta, n la ordenada en el origen, p el número de puntos experimentales, x el producto de la concentración de los componentes por el peso del comprimido e y la absorbancia.

Asimismo se calculó, para cada caso, el coeficiente de correlación lineal, r , según la ecuación:

$$r = \frac{p \cdot \Sigma(x \cdot y) - \Sigma(x) \cdot \Sigma(y)}{\{p \cdot \Sigma(x^2) - \Sigma(x) \cdot \Sigma(x)\} \{ \Sigma(y^2) - \Sigma(y) \cdot \Sigma(y) / p \}} \quad (8)$$

3.11.1.3.1.- Dosificación de los componentes cristalinos de los cálculos.

Con objeto de relacionar la composición química de la materia orgánica de los cálculos con su composición cristalina, se ha intentado, con la ayuda de la espectroscopía de absorción infrarroja

determinar la cantidad relativa de estas sustancias en una serie de muestras.

Para ello, se han elegido cálculos cuyos componentes cristalinos son la carbonato-apatita A-8 y el fosfato amónico magnésico hexahidratado (mineral estruvita).

Para calcular la proporción de estruvita, se ha elegido como banda clave la que aparece a 760 cm^{-1} (figura 6) que corresponde a las vibraciones de libración de las moléculas de agua unidas a través de enlaces de hidrógeno (21). La ecuación ajustada por mínimos cuadrados, a la curva de calibrado (figura 7) es:

$$y = 4.026x + 0.019, \quad r = 0.939 \quad (9)$$

Asimismo, para poder calcular la relación estruvita/apatita se ha tenido en cuenta la banda cercana a 570 cm^{-1} (figura 6) que corresponde a la vibración ν_4 del grupo (PO_4^{3-}) (21) común a las dos especies y la de alrededor de 600 cm^{-1} que únicamente aparece en la apatita y que corresponde también a la vibración ν_4 del PO_4^{3-} . Se ha calculado la relación de absorbancias de estas dos bandas para mezclas sintéticas de apatita y estruvita de composición conocida, y se ha construido la curva correspondiente (figura 8).

Una vez conocida la relación apatita/estruvita, se puede deducir fácilmente la concentración de apatita en el cálculo, ya que se conoce la concentración de estruvita.

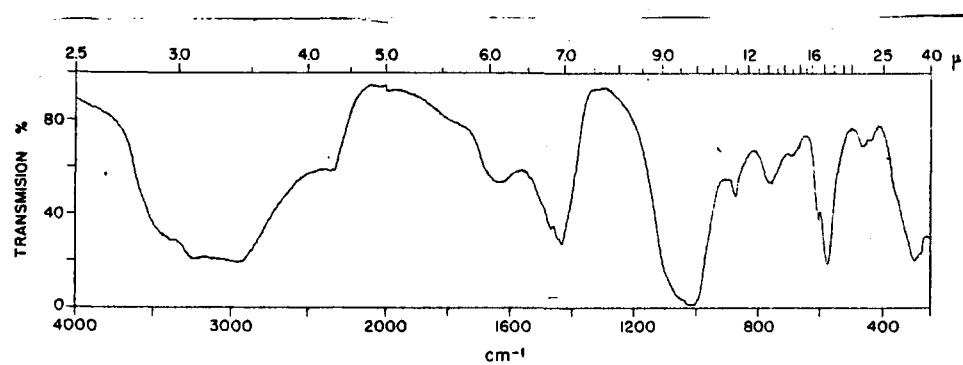


Fig. 6 .- Espectro IR de un cálculo renal conteniendo principalmente estruvita y carbonato-apatita AB.

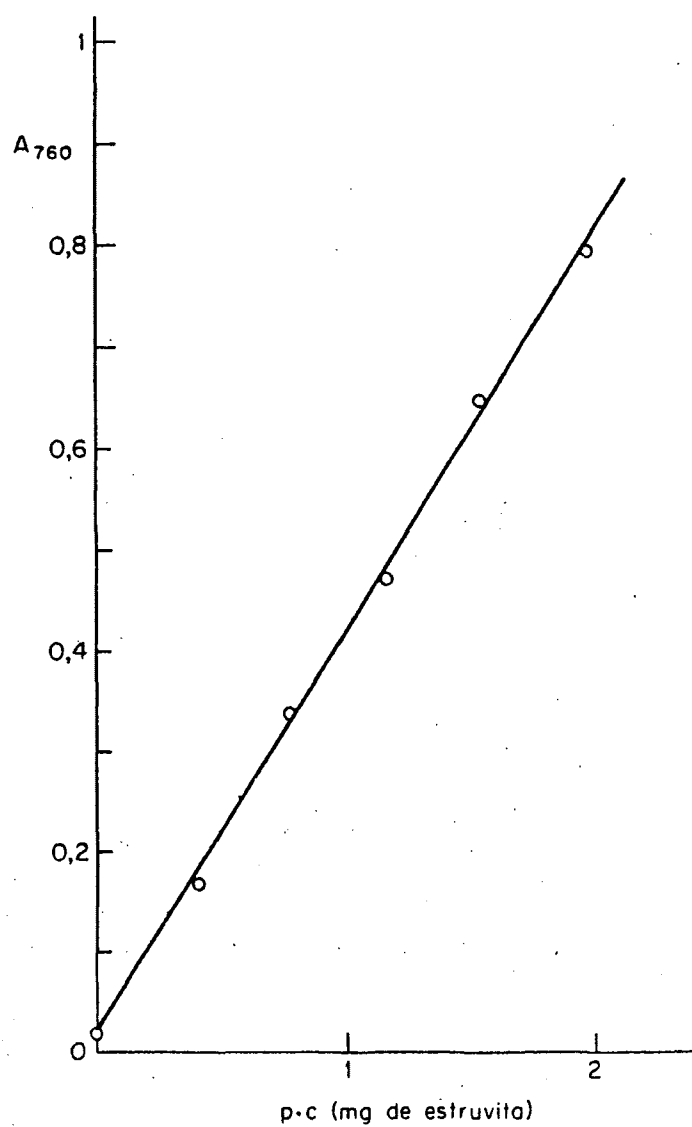


Fig. 7 .- Curva de calibrado de la estruvita. Banda clave a 760 cm^{-1} .

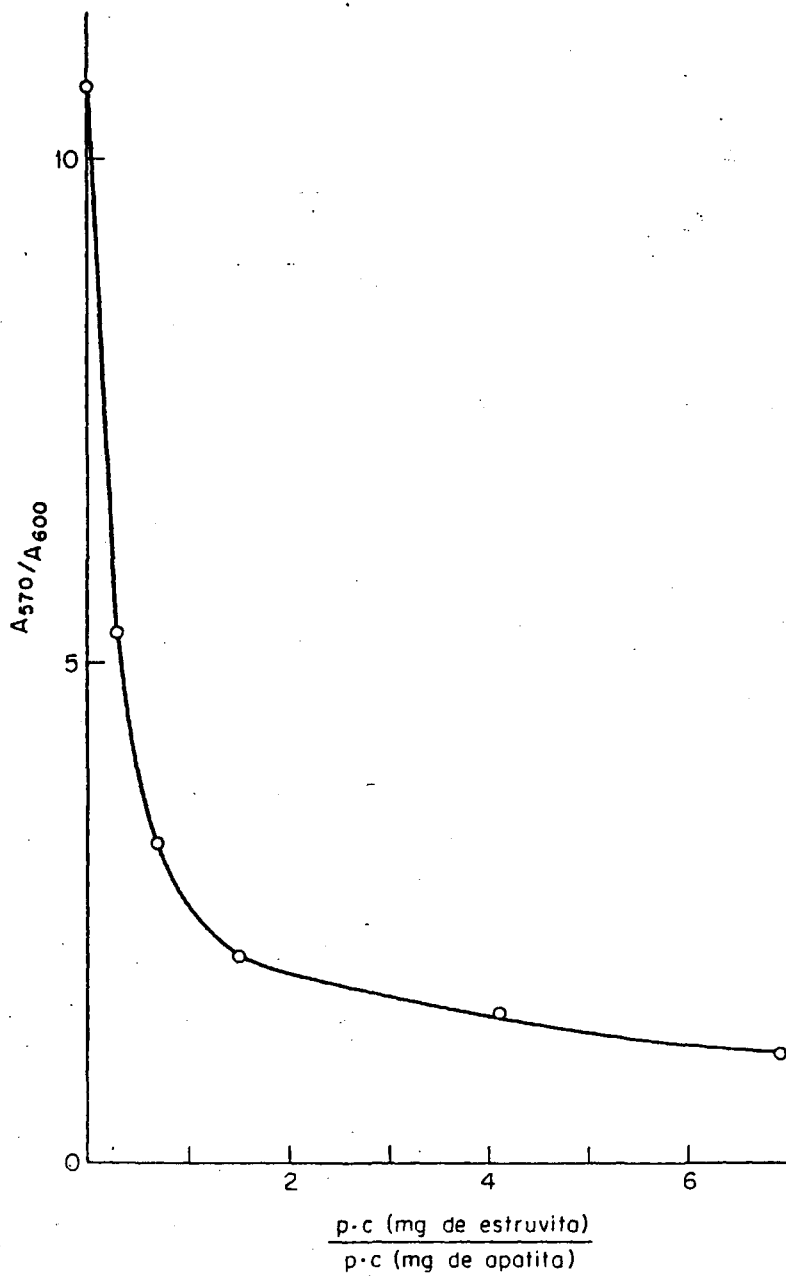


Fig. 8 .- Proporción apatita/estruvita. Relación de absorbancias A_{600}/A_{570} .

3.11.2.- Espectroscopía UV y visible.

Las medidas de absorbancias en la región del visible y del ultravioleta, se han realizado en un espectrofotómetro Beckman modelo D.U.

En general, los métodos para análisis colorimétricos consisten en formar un complejo de la sustancia a analizar con un reactivo adecuado y medir la absorbancia a una frecuencia determinada, construyendo, con la ayuda de la ley de Lambert-Beer, curvas de calibrado que se ajustan a ecuaciones por el método de los mínimos cuadrados de forma similar a lo que se ha expuesto en el apartado 3.11.1.3., para la espectroscopía de absorción infrarroja.

Por otra parte se ha utilizado el mismo instrumento para determinar la transmisión de una disolución en la que precipitan los fosfatos considerados en este trabajo. Para tal fin, la longitud de onda elegida fue 550 nm

3.11.3.- Espectroscopía de absorción atómica.

Las determinaciones de calcio se han llevado a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer de doble haz, modelo 305B con llama de aire-acetileno y lámpara de cátodo de calcio, para las muestras en las que se ha calculado la relación Ca/P. Estas muestras se han disuelto en CH₃NO₃ 6N.

Las partes alicuotas de las disoluciones de Ca⁺⁺ pertenecientes a los ensayos de crecimiento de cristales de hidroxil-apatita se

han analizado sin ningún tratamiento previo en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 303.

3.11.4.- Difracción de Rayos X.

El hecho de que los Rayos X sean difractados por materiales cristalinos, hace muy útil esta técnica desde el punto de vista analítico. En efecto, suponiendo que la difracción de Rayos X cumple la ley de Bragg:

$$n.\lambda = 2d \sin \theta \quad (10)$$

donde λ es la longitud de onda de la radiación, θ el ángulo de incidencia, n el orden de la difracción y d el espaciado entre dos planos cristalinos, al considerar los ángulos a los que aparecen los distintos picos de difracción para una longitud de onda conocida, podremos llegar a conocer el sistema cristalino de la muestra y las dimensiones de su celdilla unidad.

En este trabajo, hemos utilizado el método de la muestra en polvo. Los difractogramas se han registrado en un difractómetro Philips PW 1050 que utiliza una radiación Cu-Ni.

3.11.5.- Difracción de Rayos X a bajo ángulo.

Si los cristales apatíticos al interaccionar con los polímeros estudiados indujeran una conformación determinada de éstos, podría esperarse que estas moléculas presenten cierta periodicidad. Este hecho puede demostrarse a través de la difracción de Rayos X, pero debido a que las distancias interplanares en estos casos serían de una magnitud superior a la de los cristales inorgánicos convencionales,

nos hemos visto obligados a utilizar la técnica de difracción de Rayos X a bajo ángulo, ya que como se ha visto en el apartado anterior, la distancia interplanar, d, y el ángulo de difracción, θ, es tán inversamente relacionados según la fórmula de Bragg:

$$d = \frac{n\lambda}{2 \sin \theta} \quad (11)$$

Los difractogramas a bajo ángulo se han registrado con un generador de Rayos X de 8 Kw de la casa Rigaku-Denki con ánodo giratorio.

3.11.6.- Cromatografía de cambio iónico

La cromatografía de cambio iónico se lleva a cabo con soportes especiales, de estructura porosa e insolubles. Estos soportes con tienen grupos reactivos que están asociados a iones lábiles capaces de intercambiarlos con los del medio que les rodea. Este proceso ocurre invariablemente en medio líquido, generalmente acuoso.

Este tipo de cromatografía se emplea en la separación de sus tancias iónicas. En este trabajo, se ha utilizado un analizador automático de aminoácidos JEOL-JLC-5AH para determinar cuantitativamente los aminoácidos de las fracciones proteicas de los cálculos, previa mente hidrolizadas, como se ha visto en el apartado 3.3 .

3.11.7.- Medida de superficies específicas

Las superficies específicas de las hidroxil-apatitas no este
— quiométricas sintetizadas por nosotros en presencia ó no de las distin

tas moléculas modelo elegidas, se han medido según el método B.E.T. (30). Las muestras se han desgasificado previamente a 100° C durante 3 horas.

3.11.8.- Medida de agregación de cristales

En la mayoría de los estudios hechos hasta la fecha sobre cristales de hidroxil-apatita, se ha investigado la estructura, precipitación, nucleación, crecimiento cristalino y solubilidad olvidándose, sin embargo, del fenómeno de la agregación por el que los cristales se unen entre sí para formar conglomerados. La agregación y la desagregación de la hidroxil-apatita puede jugar un importante papel en la formación de los cálculos renales.

En este trabajo, hemos seguido un método "in vitro" descrito por Fleisch y colaboradores (11) (31) para estudiar la agregación de cristales de hidroxil-apatita sin que haya un crecimiento cristalino significativo. Este método consiste en preparar una suspensión de 375 mg de hidroxil-apatita en 250 ml de una disolución 120 mM de ClNa y 22 mM de CO_3HNa . Los cristales apatíticos se dispersan con ultrasonido durante 1 hora y la suspensión se deja agitando toda la noche a 37° C.

Asimismo, se prepara una solución metaestable que contiene $120 \cdot 10^{-3}$ moles de ClNa, $22 \cdot 10^{-3}$ moles de CO_3HNa , $3.38 \cdot 10^{-3}$ moles de Cl_2Ca y 1.67 milimoles de PO_4HNa_2 en un litro de disolución.

La agregación se inicia añadiendo 0.5 ml de la suspensión

de hidroxil-apatita 50 ml de solución metaestable en un recipiente de 100 ml con agitación. Debido a que la velocidad de agitación afecta a la agregación, todas las muestras se han agitado a la misma velocidad. La distribución de los cristales se ha determinado antes y después de 1 hora y media de incubación usando un Coulter Counter modelo D Indus. con un tubo de 140 μ m.

Se calcula, para cada experiencia, el porcentaje de cristales con un diámetro entre 4 y 13 μ con respecto al volumen total de cristales. La diferencia $C - T_0$ entre el porcentaje antes (T_0) y después (C) de la incubación representa el tanto por ciento de agregación de hidroxil-apatita.

Para medir el efecto que los polímeros estudiados tienen sobre la agregación, se añaden 100 μ l de una disolución de 0.1 mg/ml de polímero a la solución metaestable justo antes que la hidroxil-apatita y se incuba en la forma antes descrita. El porcentaje de agregación medido después de la incubación se designa con la letra S .

El coeficiente de agregación se expresa de la siguiente forma:

$$\text{Coeficiente de agregación} = \frac{S - T_0}{C - T_0} \times 100 \quad (12)$$

Un valor igual a 100 significa que el polímero no tiene efecto sobre la agregación; un valor menor de 100 que el polímero la inhibe mientras que un valor mayor que 100 indica que el polímero la estimula.

3.11.9.- Microscopía electrónica

Tanto para la microscopía electrónica de transmisión como para la difracción de electrones de áreas seleccionadas, se ha utilizado un Microscopio electrónico Siemens Elmiskop 1A con longitud de difracción fija e igual a 0.6 metros. La tensión de trabajo ha sido de 80 kv.

Cuando se ha intentado obtener la difracción para distancias interplanares de cerca de 18 \AA ó más, se ha empleado un microscopio electrónico con seis longitudes de cámara diferentes de la firma Siemens modelo 102 y la tensión de trabajo ha sido de 100 kv. La longitud de cámara para estas difracciones ha sido de 3 metros.

Se han preparado cinco tipos de muestras diferentes: hidroxil-apatita no estequiométrica, hidroxil-apatita con ácido L-aspártico, hidroxil-apatita con poli-L-aspártato sódico, hidroxil-apatita con poli-glicina y un cálculo renal apatítico.

La preparación de la muestra ha consistido en suspender 3 mg de la misma en 0.3 ml de agua destilada. Esta suspensión se somete a ultrasonido durante 4 minutos, colocando una gota de la misma sobre una rejilla de microscopio de 3 mm de diámetro que se ha recubierto previamente por una capa de colodión reforzado con carbón.

4.- CALCULOS TEORICOS

4.1.- Determinación de la conformación más estable del ion aspartato

Para determinar cuál es la conformación más estable del ión aspartato, hemos empleado el método de cálculo semi-empírico CNDO/2. La geometría de partida se detalla en la figura 9 , donde además se numeran los átomos del ion. Para establecer la geometría de la figura 9 nos hemos basado en geometrías de compuestos análogos dadas en "Interatomic Distances" (32).

En la tabla 1 se dan los resultados obtenidos para todas las conformaciones posibles del ión aspartato. Se ha caracterizado cada transición entre un par de conformaciones con una coordenada de transición conformacional, que en todos los casos representa una ó más, rotaciones alrededor de los enlaces que se detallan en la figura 9 . Damos también en esta tabla los valores del momento dipolar total de cada conformación calculados también por el método CNDO/2.

La conformación más estable posee una energía total de -118.00501498 u.a.e. y su geometría se representa en la figura 10 Esta conformación ha servido de base para calcular los cilindros de proyección y las distancias interaniónicas del ión aspartato que se utilizan en la Sección 6.1.1.

4.2.- Conformación de las macromoléculas modelo y cálculo de las distancias interaniónicas

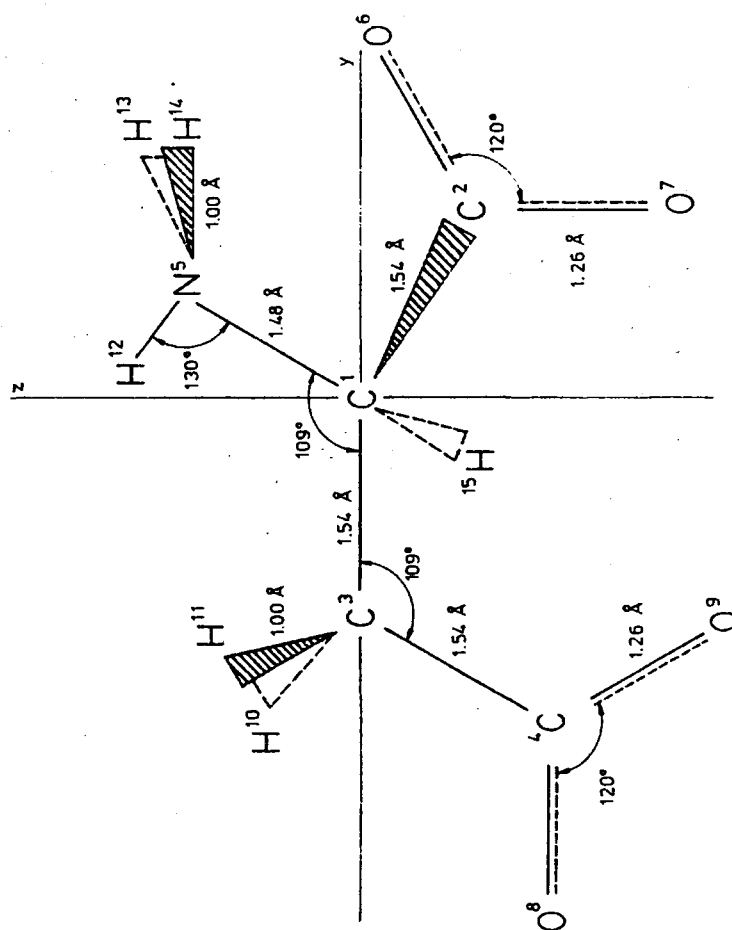


Figura 9 .- Geometría de partida del ión aspartato.

Tabla 1 .- Energías y momentos dipolares de las distintas conformaciones del ión aspartato.

Coordenada de transición conformacional	Energía (u.a.e.)	μ (Debyes)
Conformación correspondiente a la figura 10	-118.0050149800	10.57606
rot. C (1) - N y C (1) - C (2)	-117.9969754895	10.33177
rot. C (1) - C (2)	-117.9925268591	9.99660
rot. C (1) - N y C (1) - C (3)	-117.9586360246	22.02957
rot. C (1) - C (2)	-117.9579759077	22.91489
rot. C (1) - N y C (1) - C (2)	-117.9333992597	20.64329
rot. C (1) - C (2)	-117.9328190445	21.49637
rot. C (1) - N, C (1) - C (2) y C (3) - C (4)	-117.8682118447	20.62269
rot. C (1) - C (2)	-117.8635265705	21.51961
rot. C (1) - N y C (1) - C (2)	-117.8431202052	19.27511
rot. C (1) - C (2)	-117.8385533083	20.12884
rot. C (1) - C (3)	-117.8242968153	8.96963
rot. C (1) - C (2)	-117.8185129934	8.82484
rot. C (1) - N y C (1) - C (2)	-117.5864411897	9.24613
rot. C (1) - C (2)	-117.5809215759	8.86782
rot. C (1) - C (2) y C (3) - C (4)	-116.7214275820	11.22842

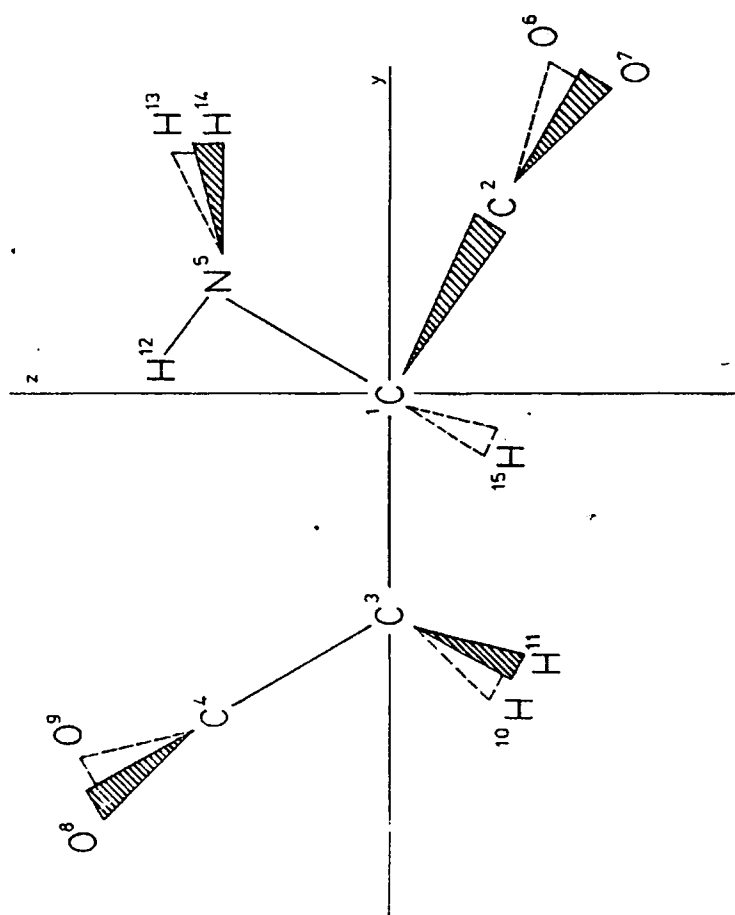


Figura 10 .- Conformación más estable del ión aspartato.

4.2.1.- Homopéptidos

Se designa por 1, 2 y 3 respectivamente, los ejes -CO-NH-, -CHR-CO- y -NH-CHR- de una cadena polipeptídica; l_1 , l_2 y l_3 son las respectivas longitudes de enlace en dichos ejes; θ_1 , θ_2 y θ_3 los ángulos de rotación interna y α_1 , α_2 y α_3 los ángulos de enlace con vértices en los átomos del carbono carbonílico, C_α y el nitrógeno, respectivamente. Entonces, una cadena polipeptídica que posea una estructura helicoidal puede describirse por tres parámetros d , ϕ y ρ , donde d es la translación entre dos átomos de carbono C_α a lo largo del eje helicoidal, ϕ el respectivo ángulo de rotación alrededor del mismo eje y ρ la distancia desde un átomo de carbono C_α al eje de la hélice. Las expresiones determinadas por Shimanouchi y Mizushima (33) para d , ϕ y ρ de un átomo C_α en una cadena polipeptídica son las siguientes:

$$d = \frac{b_1 (a_{13} + a_{31}) + b_2 (a_{23} + a_{32}) + b_3 (a_{33} - a_{11} - a_{22} + 1)}{\{(3 - a_{11} - a_{22} - a_{33}) (a_{33} - a_{11} - a_{22} + 1)\}^{1/2}} \quad (13)$$

$$\cos \phi = (a_{11} + a_{22} + a_{33} - 1) / 2 \quad (14)$$

$$\rho^2 = (b_1^2 + b_2^2 + b_3^2 - d) / (3 - a_{11} - a_{22} - a_{33}) \quad (15)$$

donde

$$\begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\cos \alpha_3 & -\sin \alpha_3 & 0 \\ \sin \alpha_3 \cos \theta_3 & -\cos \alpha_3 \cos \theta_3 & -\sin \theta_3 \\ \sin \alpha_3 \sin \theta_3 & -\cos \alpha_3 \sin \theta_3 & \cos \theta_3 \end{pmatrix} \times$$

$$x \begin{pmatrix} -\cos \alpha_1 & -\sin \alpha_1 & 0 \\ \sin \alpha_1 \cos \theta_1 & -\cos \alpha_1 \cos \theta_1 & -\sin \theta_1 \\ \sin \alpha_1 \sin \theta_1 & -\cos \alpha_1 \sin \theta_1 & \cos \theta_1 \end{pmatrix} x \quad (16)$$

$$x \begin{pmatrix} -\cos \alpha_2 & -\sin \alpha_2 & 0 \\ \sin \alpha_2 \cos \theta_2 & -\cos \alpha_2 \cos \theta_2 & -\sin \theta_2 \\ \sin \alpha_2 \sin \theta_2 & -\cos \alpha_2 \sin \theta_2 & \cos \theta_2 \end{pmatrix} \quad (17)$$

$$b_1 = l_2 \cos \alpha_3 \cos \alpha_1 - l_2 \sin \alpha_3 \sin \alpha_1 \cos \theta_1 - l_1 \cos \alpha_3 + l_3.$$

$$b_2 = -l_2 \sin \alpha_3 \cos \theta_3 \cos \alpha_1 - l_2 \cos \alpha_3 \cos \theta_3 \sin \alpha_1 \cos \theta_1 - \\ - l_2 \sin \theta_3 \sin \alpha_1 \sin \theta_1 + l_1 \sin \alpha_3 \cos \theta_3. \quad (18)$$

$$b_3 = -l_2 \sin \alpha_3 \sin \theta_3 \cos \alpha_1 - l_2 \cos \alpha_3 \sin \theta_3 \sin \alpha_1 \cos \theta_1 + \\ + l_2 \cos \theta_3 \sin \alpha_1 \sin \theta_1 + l_1 \sin \alpha_3 \sin \theta_3. \quad (19)$$

Las longitudes de enlace y ángulos de enlace que hemos introducido en las expresiones anteriores han sido los citados en la literatura (34). Con estos datos y teniendo en cuenta que $\theta_1 = 180^\circ$ (por tratarse del enlace peptídico) y $\phi = 120^\circ$ (tres monómeros por cada giro de 360° alrededor del eje de la hélice), de la expresión del $\cos \phi$ se pueden determinar los ángulos de rotación interna θ_2 y θ_3 . Una vez hallados estos valores se pueden calcular los de \underline{p} y \underline{d} a partir de las expresiones indicadas anteriormente.

4.2.2.- Acido poliacrílico

En este caso, los ángulos de enlace, α , longitudes de enlace, l , y ángulos de rotación interna, θ , son prácticamente iguales a lo largo del esqueleto helicoidal (35) y, por tanto, las expresiones obtenidas para determinar los parámetros ϕ , d y ρ son las siguientes (33):

$$\cos \phi = \frac{1}{2} (-\cos \alpha + \cos \theta - \cos \alpha \cos \theta - 1) \quad (20)$$

$$d^2 = l^2 (1 - \cos \theta) (1 - \cos \alpha) / (3 + \cos \alpha - \cos \theta + \cos \alpha \cos \theta) \quad (21)$$

$$\rho^2 = 2l^2 (1 + \cos \alpha) / (3 + \cos \alpha - \cos \theta + \cos \alpha \cos \theta)^2 \quad (22)$$

Introduciendo en las expresiones anteriores los valores de α y l de la literatura (35) y teniendo en cuenta que $\phi = 120^\circ$, se puede hallar θ y, posteriormente, los parámetros d y ρ . Los correspondientes valores se incluyen en la tabla 2. La misma tabla presenta, asimismo, las distancias entre los grupos carboxilo situados en la misma "generatriz" de los segmentos helicoidales del polímero, y los valores de estos parámetros obtenidos para los homopéptidos utilizados en este trabajo. Para estas moléculas peptídicas y como indica la mencionada tabla, se han obtenido los valores de θ_2 y θ_3 a partir de un valor de $\phi = 120^\circ$, puesto que la expresión del $\cos \phi$ es de segundo grado con respecto a θ_2 y θ_3 . Por ello, se han obtenido también dos valores para cada uno de los parámetros helicoidales y para las distancias entre los grupos carboxilo situados en la misma generatriz. Estas, evidentemente, resultan de multiplicar por 3 (3 monómeros por cada giro helicoidal de 360°) los valores obtenidos para d .

Tabla 2 .- Parámetros conformacionales de las cadenas de las macromoléculas poliácidas estudiadas.

	θ_1	θ_2	θ_3	$d(\text{\AA})$	$\rho(\text{\AA})$	ϕ	$r_{\text{COO}}(\text{\AA})$
Acidos poli-L-glutámico y poli-L-aspartico	180°	37.73°	37.73°	2.00	1.841	120°	6.00 *
	180°	142.27°	142.27°	2.51	1.843	120°	7.54 *
	θ						
Acido		104.5°		1.14	0.58	120°	3.42 *
poli-acrílico		180°		1.59	0.44	180°	3.18 **

* Estructura helicoidal

** Cadena plana en zig-zag

5.-RESULTADOS

5.1.-Análisis de las fracciones orgánicas de cálculos renales

Los resultados de la desmineralización de los cálculos estudiados parecen indicar, según la información que nos suministra la espectroscopía de absorción infrarroja, que se han obtenido unas fracciones orgánicas similares en todos los casos. En las figuras 11, 12 y 13 se presentan los espectros IR de tres de ellas. En estos espectros puede observarse que las proteínas están presentes, en gran proporción dentro de estas fracciones (bandas amida I hacia 1645 cm^{-1} y amida II hacia 1540 cm^{-1}). Como consecuencia de esto, decidimos elegir como moléculas modelo fundamentales, las relacionadas con las proteínas tales como aminoácidos y péptidos. En algunos casos referentes al estudio de la cristalización de la hidroxil-apatita, hemos elegido moléculas modelo que no son de tipo proteico (ácido poliacrílico) con el fin de comparar ciertos parámetros estructurales y estudiar su influencia en la cristalización de hidroxil-apatita.

En la tabla 3 se incluyen los resultados obtenidos en el análisis de aminoácidos de las distintas fracciones orgánicas obtenidas, que se expresan como fracciones molares, considerando solamente los componentes identificados. Asimismo, hay que tener en cuenta que el triptófano se degrada en el proceso de hidrólisis ácida, y que la cistina se rompe en dicho proceso produciendo cisteína. Se han detectado diecisiete aminoácidos distintos, de los cuales los más abundantes son el ácido L-aspartico y el ácido L-glutámico, aunque en algunos casos aparece algún componente en concentración parecida a la de los aminoácidos ácidos.

A partir de todos estos resultados, se eligieron como moléculas

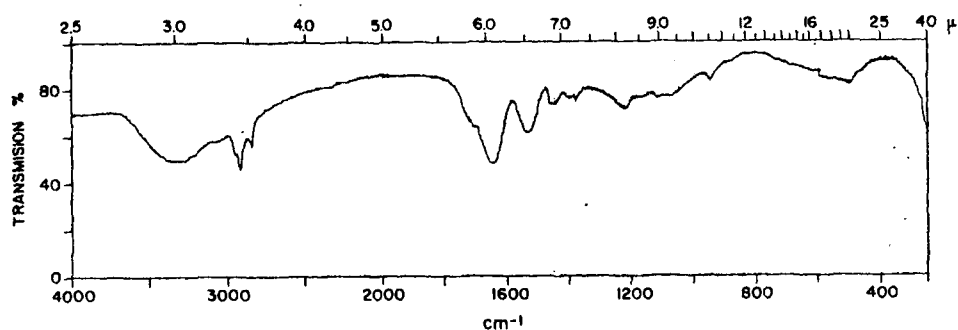


Fig. 11 .- Espectro IR de la fracción orgánica de un cálculo renal apatítico.

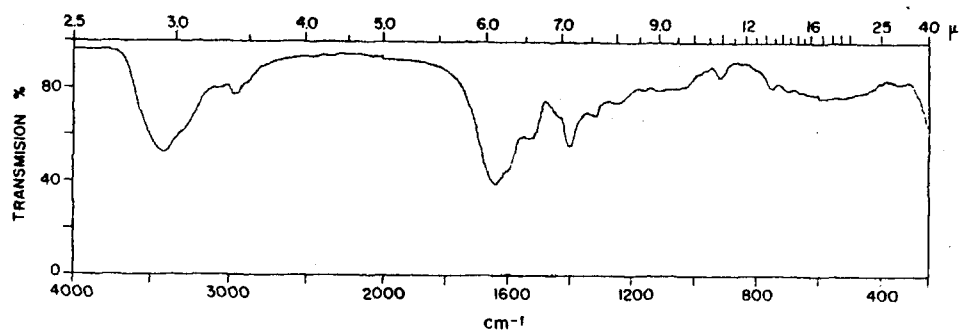


Fig. 12 .- Espectro IR de la fracción orgánica de un cálculo renal de oxalato cálcico monohidrato.

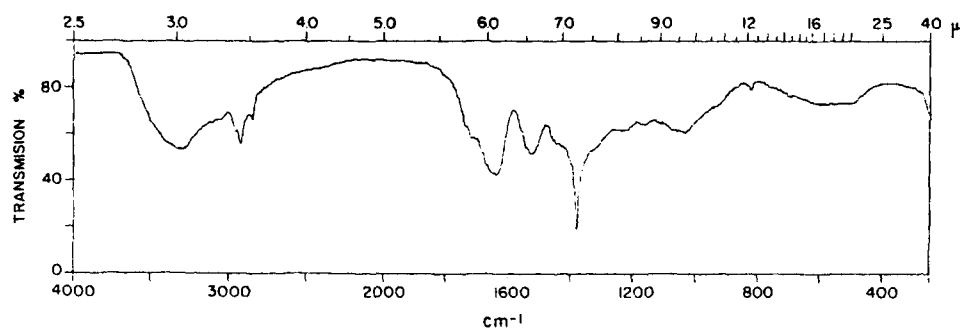


Fig. 13 .- Espectro IR de la fracción orgánica de un cálculo renal de estruvita.

Tabla 3.- Análisis de aminoácidos de las fracciones orgánicas de cálculos*

	Apatita + Estruvita		Apatita (prostáticos)		Oxalato cálcico monohidr.	Apatita + Estruvita + + Oxalato		Cistina
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
Lys	0.076	0.080	0.068	0.096	0.039	0.058	—	0.052
His	0.017	0.103	0.023	0.028	0.011	0.029	0.078	0.014
Arg	0.060	0.053	0.019	0.045	0.053	0.045	0.038	0.056
Asp	0.155	0.115	0.122	0.096	0.132	0.089	0.109	0.104
Thr	0.064	0.079	0.059	0.049	0.069	0.046	0.054	0.060
Ser	0.020	0.039	0.061	0.054	0.076	0.047	0.058	0.057
Glu	0.185	0.108	0.146	0.121	0.139	0.107	0.106	0.139
Pro	0.070	0.022	0.109	0.118	0.055	0.023	0.045	0.049
Gly	0.031	0.101	0.078	0.081	0.085	0.079	0.096	0.072
Ala	0.029	0.047	0.094	0.083	0.081	0.073	0.058	0.071
Cys	—	0.017	0.025	0.021	—	—	0.022	0.021
Val	0.051	0.038	0.049	0.048	0.073	0.047	0.036	0.054
Met	0.020	0.014	0.009	0.011	0.011	0.015	0.013	0.016
Ile	0.046	0.031	0.069	0.068	0.038	0.051	0.026	0.063
Leu	0.120	0.078	0.009	0.008	0.094	0.080	0.068	0.103
Tyr	—	0.026	0.039	0.048	—	—	0.019	—
Phe	0.056	0.050	0.023	0.027	0.046	0.210	0.173	0.068

* fracciones molares

las modelo estos dos aminoácidos, así como sus respectivos homopolímeros. También se eligió como término de comparación un aminoácido básico, la L-arginina, y la N-metil acetamida como unidad estructural de la cadena peptídica.

5.2.- Nucleación de hidroxil-apatita no estequiométrica.

En la tabla 4 se incluyen los valores de las transmitancias obtenidas en la precipitación de apatita, partiendo de diferentes concentraciones de calcio, fósforo y moléculas modelo. Es evidente que al hacer consideraciones sobre la nucleación de apatita, se tendrán en cuenta los primeros valores de transmitancias obtenidos ya que es difícil separar la nucleación del crecimiento de cristales a medida que aumenta el tiempo de la precipitación. En dicha tabla se advierte como nota más característica el hecho de que cuando las concentraciones de calcio y fosfato aumentan el doble, se pasa de un retardo aparente de la precipitación a una aceleración de la misma, fenómeno que se discute más adelante. Estos dos tipos de influencia en la precipitación los hemos desglosado en las figuras 14 y 15. En la primera se incluyen los valores de las transmitancias a 550 nm para la precipitación de la apatita partiendo de unas concentraciones 0.092 mM de cloruro cálcico y 0.052 mM de fosfato disódico. La figura 15 muestra los valores de estas transmitancias obtenidos cuando las concentraciones de los reactivos mencionados son el doble.

Análogamente, en la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para la precipitación de brushita, que vienen representados gráficamente en la figura 16. En este caso se advierten unas transmitancia inferiores cuando la precipitación se realiza en presencia de áci

Tabla 4 .- Transmitancias, a 550 nm , de la nucleación de hidroxil-apatita no estequiométrica.

t (min)	[Ca ²⁺] = 0.092 mM, [PO ₄ H ⁻] = 0.052 mM				[Ca ²⁺] = 0.184 mM, [PO ₄ H ⁻] = 0.104 mM		
	Hidroxil-apatita sola	Acido L-glutámico	Poli-L-glutámico	Poliacrílico	Hidroxil-apatita sola	Poli-L-glutámico	Poliacrílico
1	98.0	98.4	99.8	98.6	94.8	90.5	93.8
2	97.6	98.1	99.6	98.5	94.0	89.5	93.2
3	97.6	98.1	99.6	98.5	94.0	89.2	93.0
4	97.6	98.1	99.6	98.5	93.8	89.5	93.0
5	97.6	97.7	99.6	98.5	94.0	88.8	92.0
6	97.2	97.7	99.6	98.5	94.0	89.5	92.0
7	97.2	97.7	99.6	98.5	94.0	89.5	92.0
8	97.2	97.7	99.6	98.5	94.0	89.5	92.0
9	97.2	97.7	99.6	98.5	94.0	89.5	92.0
10	97.1	97.7	99.4	98.5	94.0	89.5	91.5
11	97.1	97.7	99.4	98.5	94.0	89.5	91.5
12	97.1	97.7	99.4	98.5	94.0	89.5	91.5
13	97.1	97.7	99.4	98.5	94.0	89.5	91.5
14	96.8	97.7	99.4	98.5	94.0	89.5	91.5
15	96.8	97.4	99.4	98.2	94.0	89.5	91.5
16	96.8	97.4	99.4	98.2	94.0	89.5	91.5
17	96.8	97.4	99.4	98.2	94.0	89.5	91.5
18	96.8	97.4	99.4	98.2	94.0	89.5	91.5
19	96.8	97.4	99.4	98.2	94.0	89.5	91.5
20	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
21	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
22	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
23	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
24	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
25	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
26	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
27	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
28	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
29	96.8	97.3	99.2	98.2	94.0	89.5	91.5
30	96.8	97.3	99.1	98.2	94.0	89.5	91.5

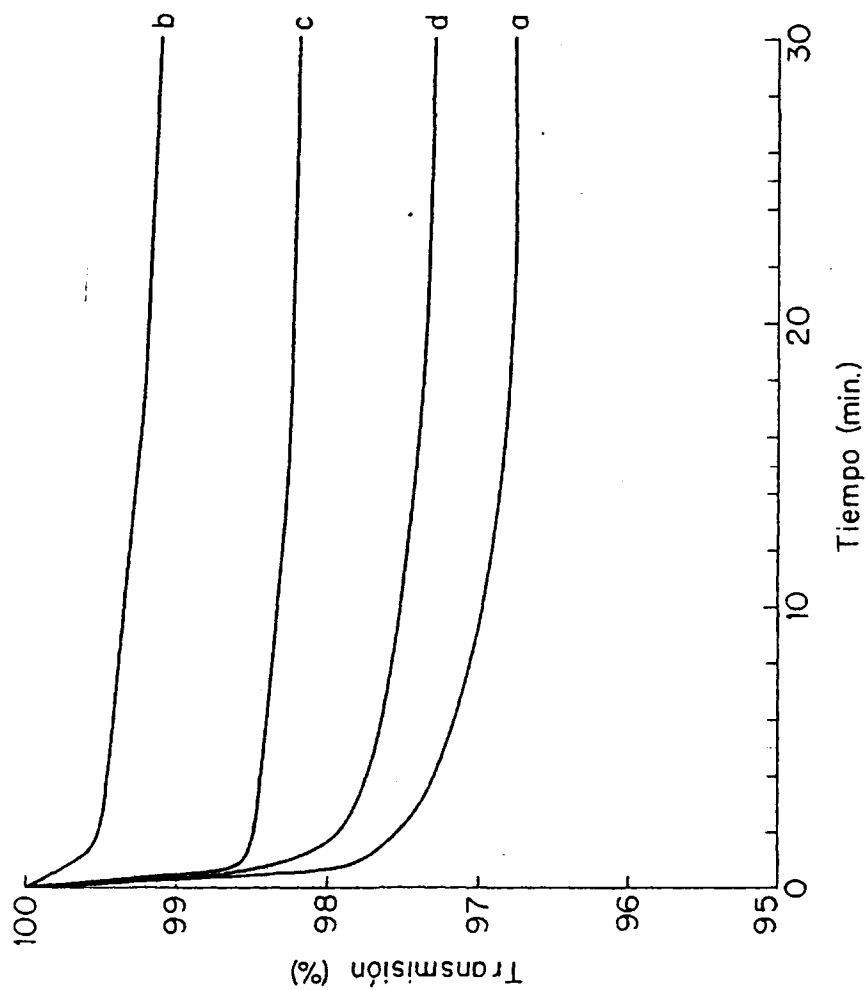


Fig. 14.- Transmittancias, a 550 nm, de la nucleación de hidroxil-apatita. $\text{Ca}^{++} = 0.092 \text{ mM}$, $\text{PO}_4\text{H}^{2-} = 0.052 \text{ mM}$. a) hidroxil-apatita sola; b) con ácido poli-L-glutámico; c) con ácido poliacrílico; d) con ácido L-glutámico.

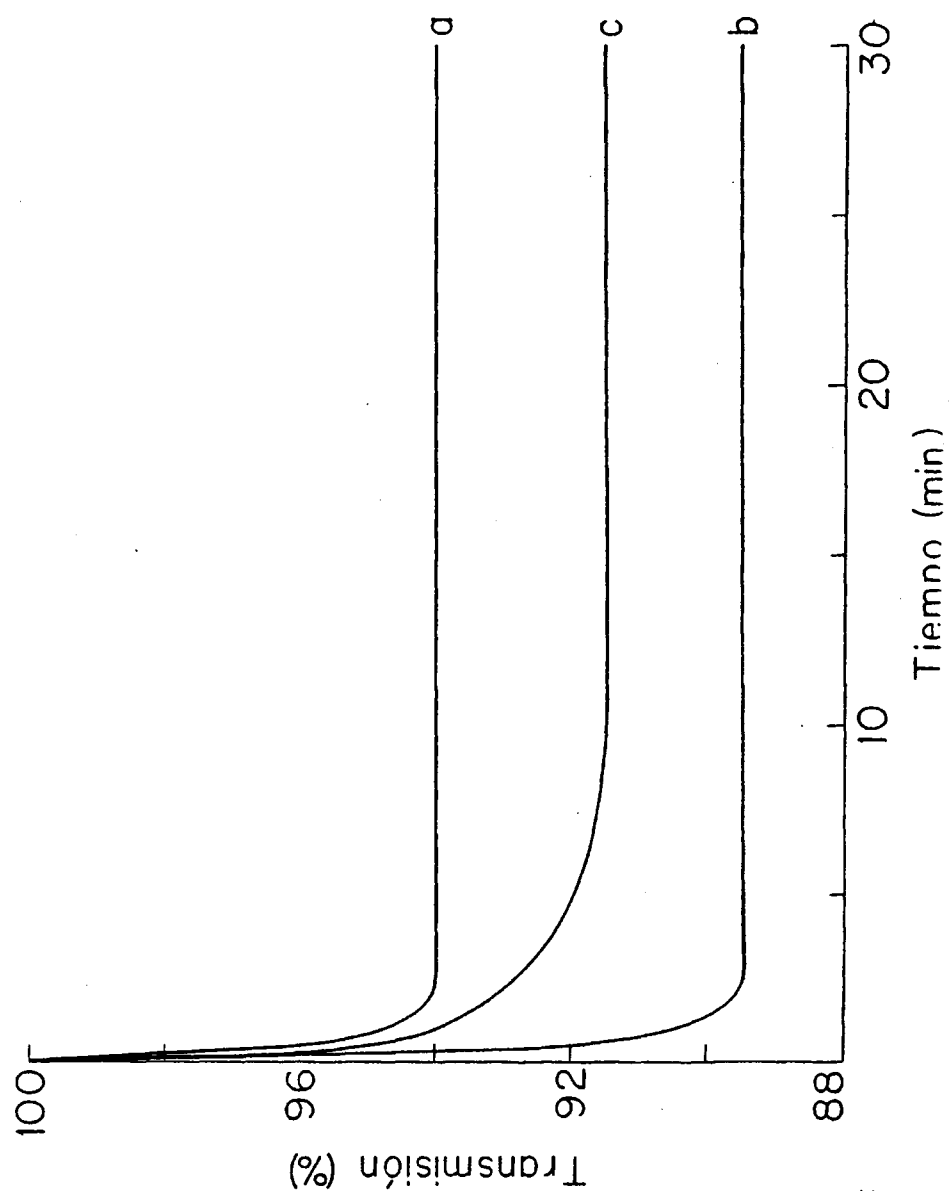


Fig. 15.- Transmisiones, a 550 nm, de la nucleación de hidroxil-apatita. $\text{Ca}^{++} = 0.184 \text{ mM}$, $\text{PO}_4\text{H}^- = 0.104 \text{ mM}$. a) hidroxil-apatita sola; b) con ácido poli-L-glutámico; c) con ácido poliacrílico.

Tabla 5 .- Transmitancias, a 550 nm, de la nucleación de brushita.

t (min)	Brushita	Acido L-glutámico	Poli-L-glutámico	Poliacrílico
1	99.5	99.8	97.0	99.4
2	99.2	99.5	95.1	99.2
3	99.0	99.3	92.0	99.0
4	98.4	98.7	90.5	98.6
5	98.0	98.4	89.3	98.3
6	97.8	97.9	88.3	97.3
7	97.5	97.6	87.4	97.2
8	97.0	97.5	86.5	97.0
9	96.5	97.1	85.8	96.3
10	96.5	96.9	85.1	96.1
11	96.1	96.7	84.8	96.0
12	95.9	96.5	84.1	95.6
13	95.5	96.2	83.8	95.4
14	95.1	95.9	83.3	95.0
15	94.8	95.6	83.1	94.7
16	94.5	95.4	82.8	94.4
17	94.5	95.4	82.4	94.3
18	93.8	95.2	82.0	93.8
19	93.5	95.0	81.7	93.8
20	93.1	94.7	81.4	93.3
21	92.8	94.2	81.2	92.6
22	92.4	94.0	81.2	92.2
23	91.8	93.7	80.8	91.7
24	91.5	93.6	80.6	91.5
25	91.0	93.6	80.4	90.9
26	90.6	93.5	80.4	90.8
27	90.2	93.5	80.0	90.5
28	89.6	93.5	79.8	89.7
29	89.4	93.5	79.5	89.1
30	88.8	93.3	79.3	88.7

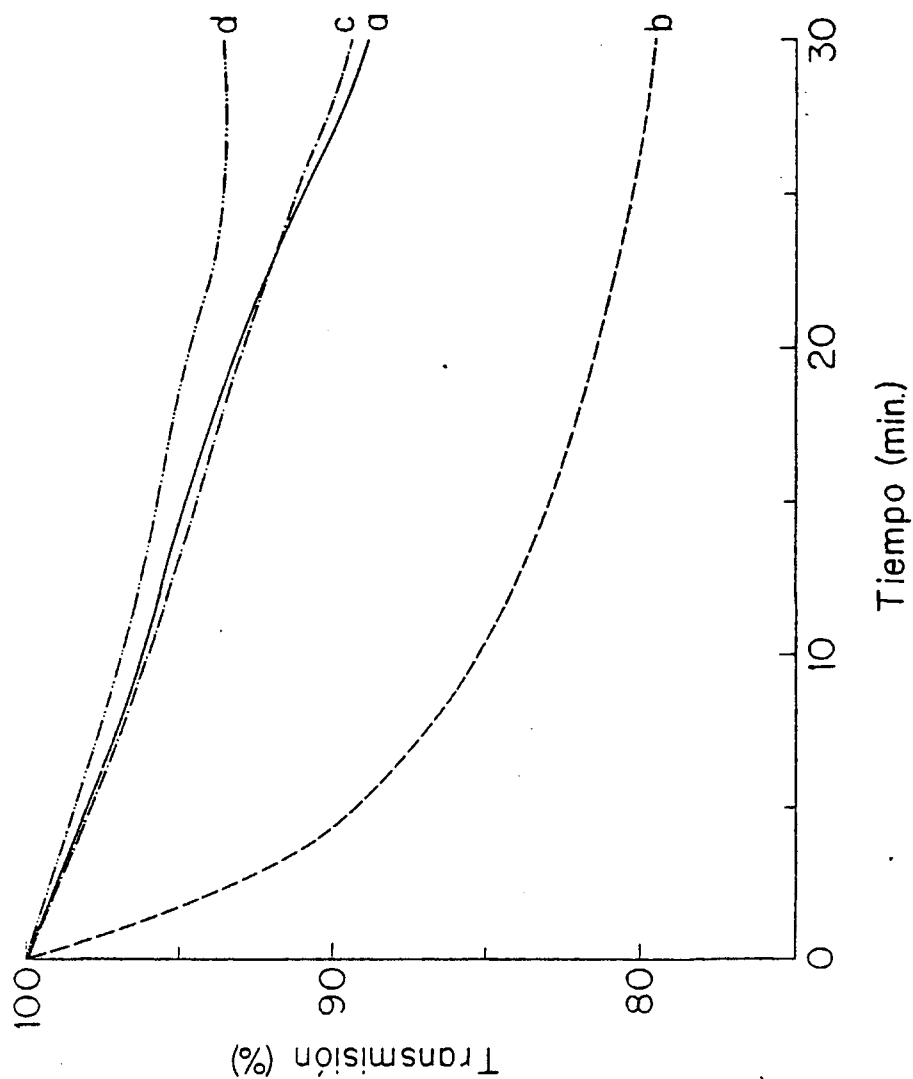


Fig. 16 .- Transmitancias, a 550 nm , de la nucleación de brushita. a) brushita sola; b) con ácido poli-L-glutámico; c) con ácido poliacrílico; d) con ácido L-glutámico.

do poli-L-glutámico.

Finalmente, en la tabla 6 se muestran los tantos por ciento acumulativos de partículas con un diámetro superior al indicado en la primera columna, para la precipitación de la hidroxil-apatita no estequiométrica ($\{Ca^{++}\} 9.2 \cdot 10^{-5} M$, $\{PO_4H^-\} = 5.2 \cdot 10^{-5} M$) en presencia de ácido poli-L-glutámico, a distintas concentraciones. Con estos ensayos se ha intentado estudiar la influencia de la concentración de polímero añadido sobre el tamaño de partícula de la hidroxil-apatita precipitada.

5.3.- Adsorción de moléculas modelo.

5.3.1.- N-metil acetamida.

En las figuras 17 y 18 se muestra el espectro infrarrojo de la N-metil acetamida deuterada adsorbida sobre hidroxil-apatita cálcica deuterada, tras diferentes tiempos de exposición del adsorbente en presencia de N-metil acetamida. Asimismo, la figura 19 incluye, respectivamente, los espectros infrarrojos de esta sustancia deuterada en estado líquido y en disolución diluida de CCl_4 . Por otra parte, en la tabla 7 se dan los valores de las frecuencias correspondientes a las ν (N-D), amida I y amida II de esta sustancia adsorbida sobre apatita cálcica, estróncica y bárica (figura 20), así como las frecuencias de este derivado isotópico en estado líquido y en disolución diluida de CCl_4 .

5.3.2.- Ácidos L-aspártico y L-glutámico.

En las figuras 21 y 22 están representados los espectros in

Tabla 6 .- Porcentajes de partículas de suspensiones cristalinas de hidroxil-apatita recién precipitada.

[Pol-L-Glu] = $5.3 \cdot 10^{-4}$ N		[Pol-L-Glu] = $10.6 \cdot 10^{-4}$ N	
diámetro (μ)	% acumulativo	diámetro (μ)	% acumulativo
41.0	8.5	125.0	6.6
32.8	9.0	99.8	17.3
26.0	9.5	79.13	19.2
20.68	14.24	62.92	28.8
16.41	16.61	49.93	43.2
13.1	17.8	39.85	50.5
10.51	19.87	31.97	54.25
8.35	20.6	25.4	58.06
6.72	21.96	20.4	60.8
5.4	22.5	16.17	62.64
4.21	22.65	12.8	64.5
3.35	23.36	10.2	65.85
2.74	23.5	8.3	66.83
2.27	23.8	7.0	67.85
1.8	24.6	5.5	67.8
		4.6	72.17

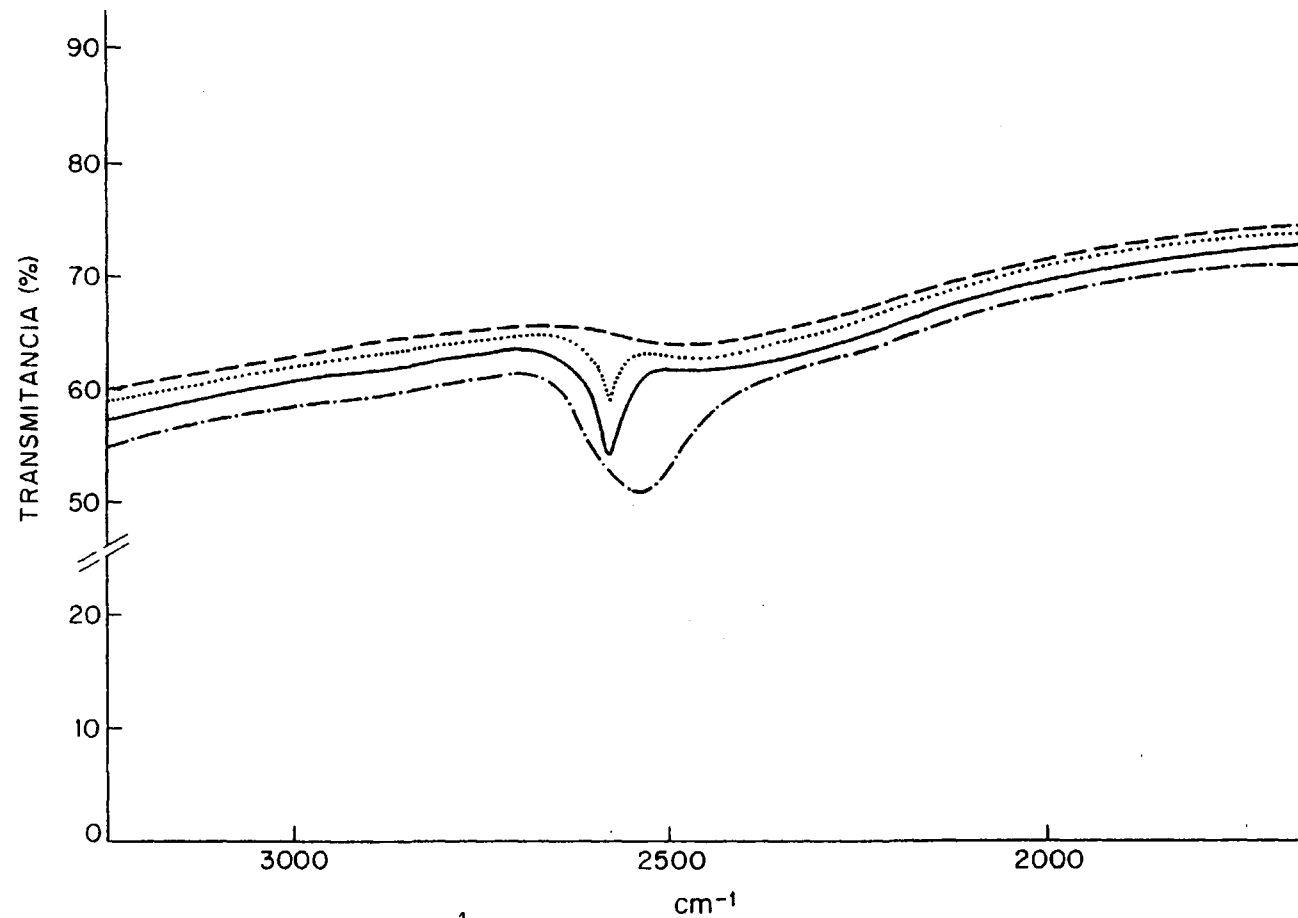


Fig. 17 .- Espectro IR (3200-1700 cm⁻¹) de la N-metil acetamida N-deuterada adsorbida sobre hidroxil-apatita no estequiométrica. (- - -):hidroxil-apatita sola; (....):hidroxil-apatita+N-metil acetamida, 2 horas; (—): idem, 5 horas; (-·-·-·): idem, 24 horas.

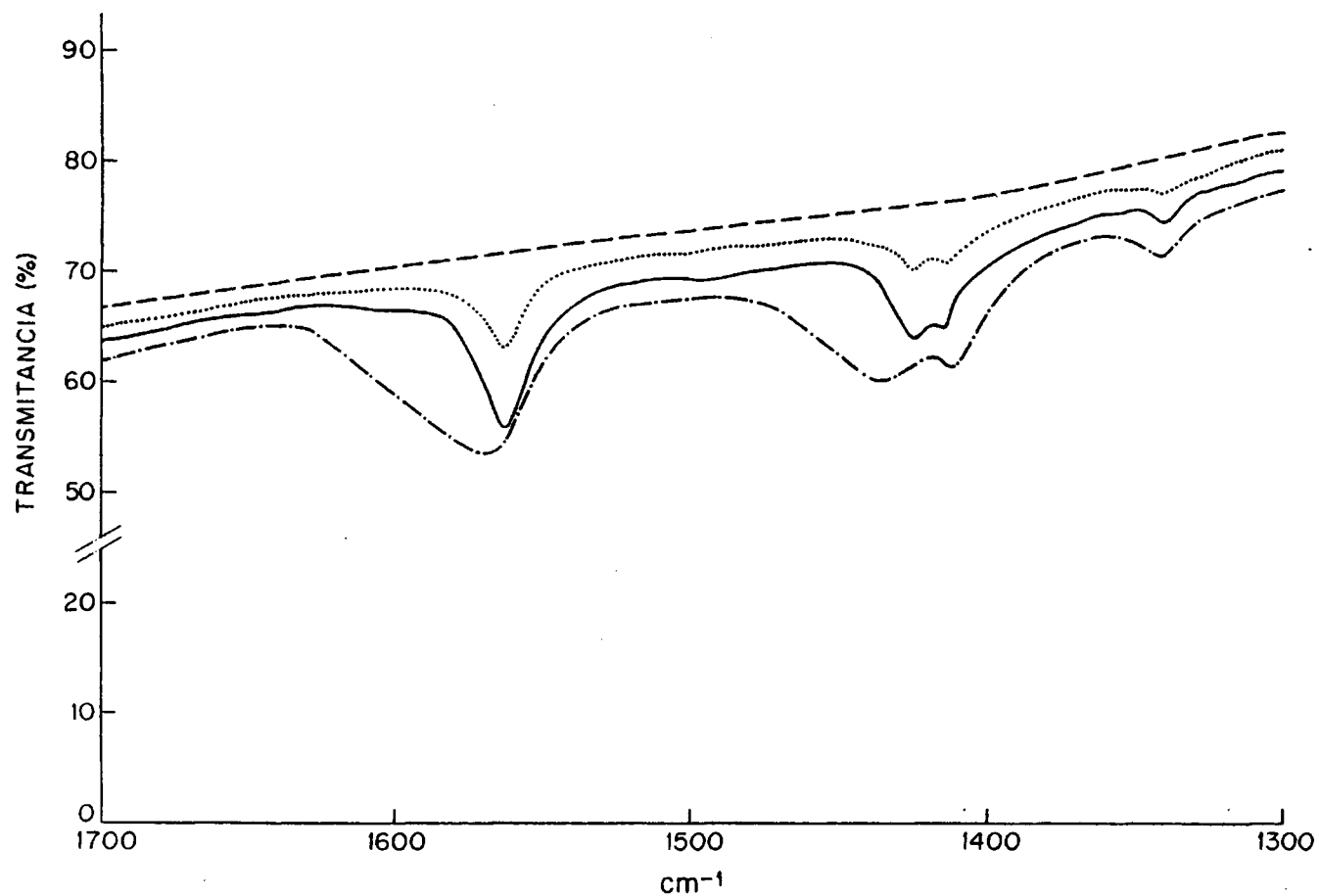


Fig. 18 .- Espectro IR ($1700-1300\text{ cm}^{-1}$) de la N-metil acetamida N-deuterada adsorbida sobre hidroxil-apatita no estequiométrica. (---): hidroxil-apatita sola; (....): hidroxil-apatita+N-metil acetamida, 2 horas; (—): idem, 5 horas; (-·-·-): idem, 24 horas.

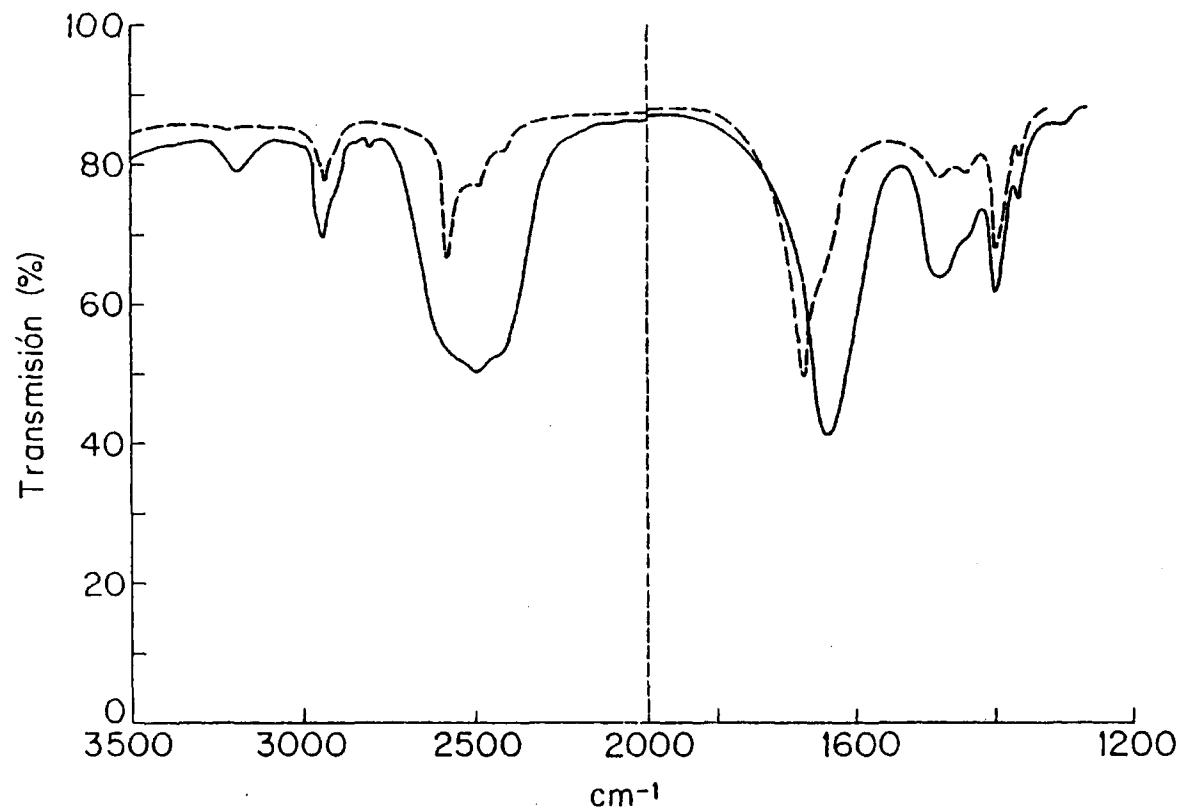


Fig. 19.- Espectro IR de la N-metil acetamida N-deuterada en líquido (film) (—) y en disolución diluida de CCl₄ (l=0,1 mm) (- - -).

Tabla 7 .- Números de ondas (cm^{-1}) de la N-metil acetamida N-deuterada en líquido, disolución y adsorbida sobre la hidroxil-apatita no estequiométrica.

<u>$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{ND} - \text{CH}_3$ + hidroxil-apatita</u>			
Apatita	ν (N-D)	Amida I	Amida II
de calcio	2569	1563	1425
de estroncio	2570	1568	1424
de bario	2571	1571	1422
 <u>$\text{CH}_3 - \text{CO} - \text{ND} - \text{CH}_3$</u>			
líquido	2480	1635	1480
en CCl_4 (1.5%;w:w)	2578	1688	1406
(cis libre)	2540*		
(trans libre)	2578*		

* Referencia (36)

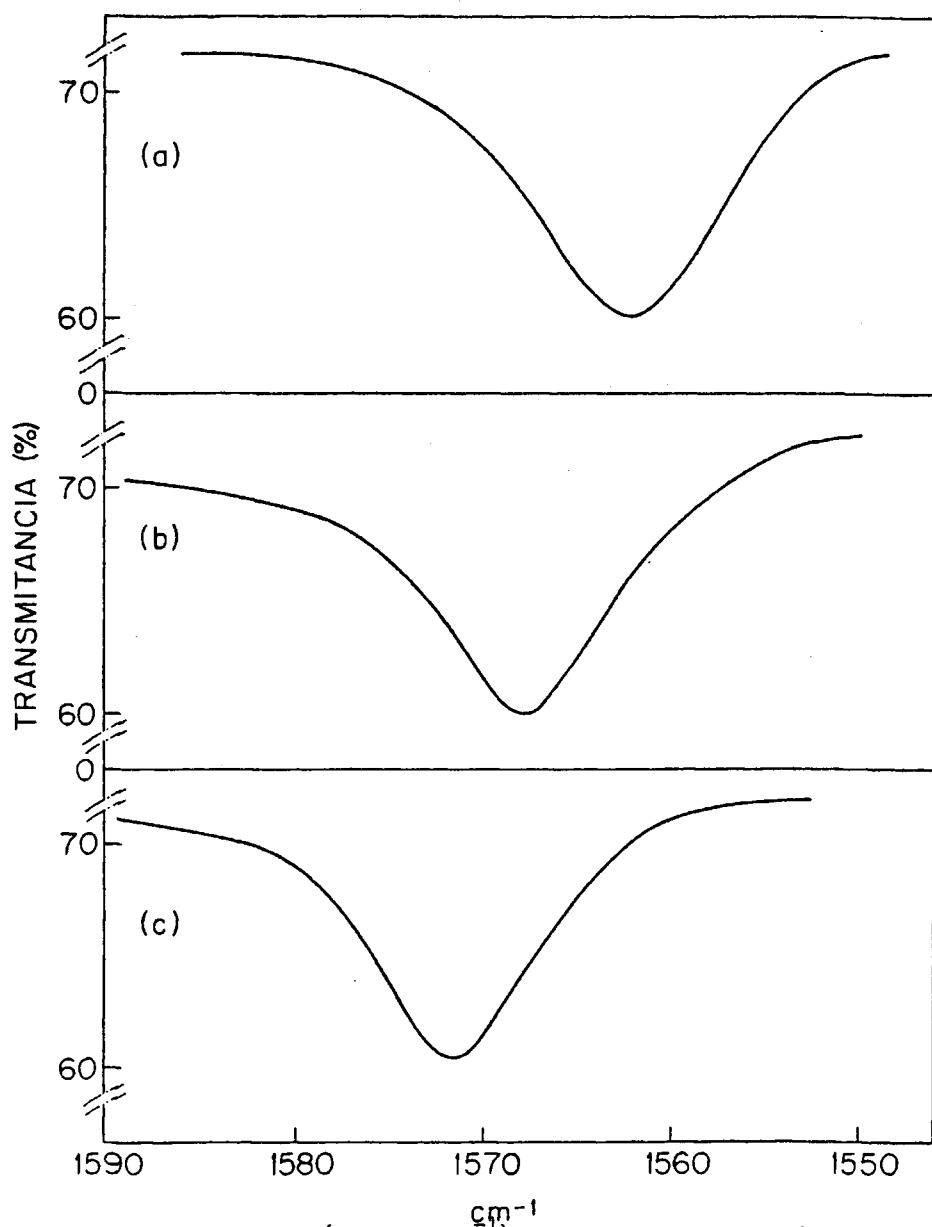


Fig. 20.- Espectros IR (1590-1550 cm⁻¹) de la N-metil acetamida N-deuterada adsorbida sobre: a) hidroxil-apatita cálcica; b) hidroxil-apatita estróncica; c) hidroxil-apatita bária.

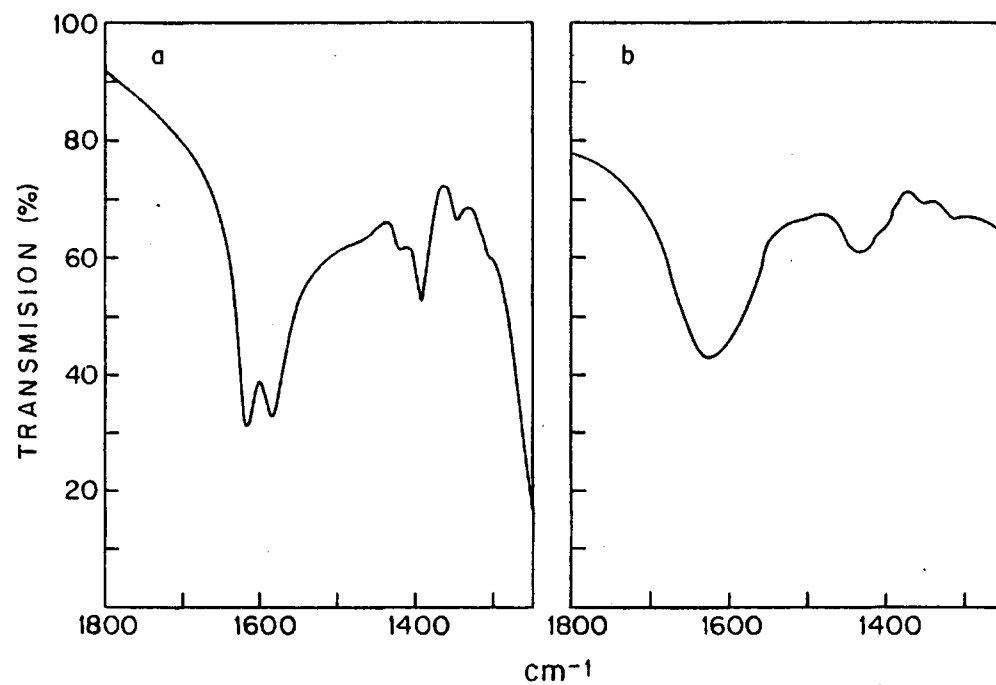


Fig. 21 .- a) Espectro IR del ácido L-aspartico en D_2O ($l = 0,025$ mm). b) Espectro IR del ácido L-aspartico adsorbido sobre hidroxil²-apatita no estequiométrica, en BrK.

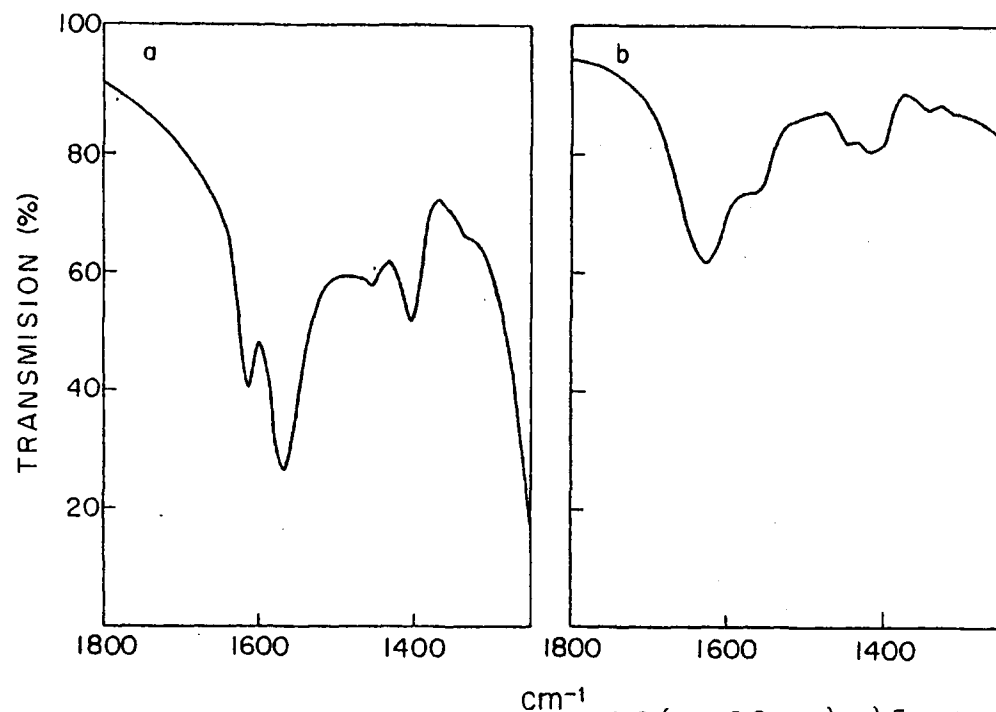


Fig. 22.- a) Espectro IR del ácido L-glutámico en D_2O ($l = 0.025$ mm). b) Espectro IR del ácido L-glutámico adsorbido sobre hidroxil-apatita no estequiométrica, en BrK .

frarrojos de estas sustancias en disolución de agua pesada (a pH 8) y los de estos mismos compuestos adsorbidos sobre la apatita. La asignación de estos espectros la hemos realizado por comparación con los publicados en la literatura (37). En el caso de los espectros en disolución de D_2O se ha elegido la región espectral comprendida entre 1800 y 1200 cm^{-1} , puesto que en ella aparecen las bandas más intensas y características del ión carboxilato, cuyas frecuencias sufren un desplazamiento cuando estas sustancias se adsorben sobre la apatita. En efecto, los espectros infrarrojos de estos aminoácidos en disolución acuosa poseen bandas de absorción características hacia 1600 y 1395 cm^{-1} , asociadas respectivamente con las vibraciones $\nu_{as}(COO^-)$ y $\nu_s(COO^-)$. La banda situada a 1395 cm^{-1} se desplaza hacia 1415 cm^{-1} cuando estos aminoácidos están adsorbidos sobre la hidroxil-apatita.

Los resultados que se han obtenido en la determinación de las isotermas de adsorción de estas sustancias (figuras 23 y 25), parecen seguir el modelo de adsorción de Langmuir (10) (38). La ecuación correspondiente incluye como variables la relación entre la cantidad de aminoácido adsorbido por gramo de apatita, Q , y la concentración final de sustancia en la disolución, C :

$$\frac{C}{Q} = \frac{C}{N} + \frac{1}{KN} \quad (23)$$

Por otra parte, estos dos tipos de valores vienen relacionados en las figuras 24 y 26 considerando en ordenadas C/Q y en abscisas C . Las ordenadas en el origen de estas representaciones vienen dadas por la expresión $1/KN$, siendo K una constante directamente relacionada con la afinidad de las moléculas de adsorbato por la apatita

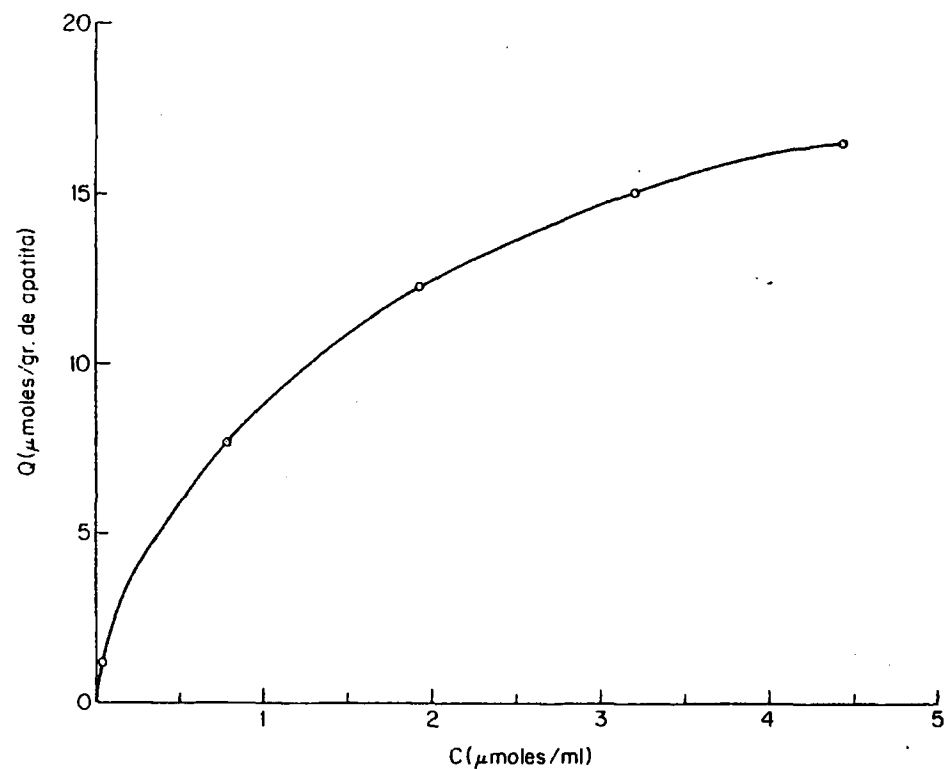


Fig.23 .- Isoterma de adsorción del ácido L-aspártico adsorbido sobre hidroxil-apatita no estequiométrica.

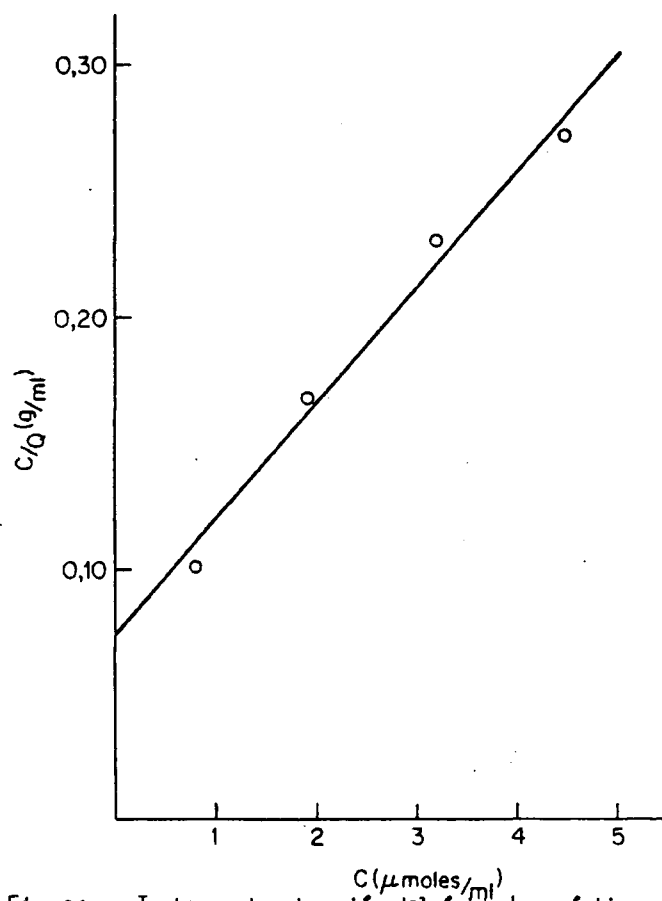


Fig. 24 .- Isotherma de adsorción del ácido L-aspártico adsorbido sobre hidroxil-apatita no estequiométrica.

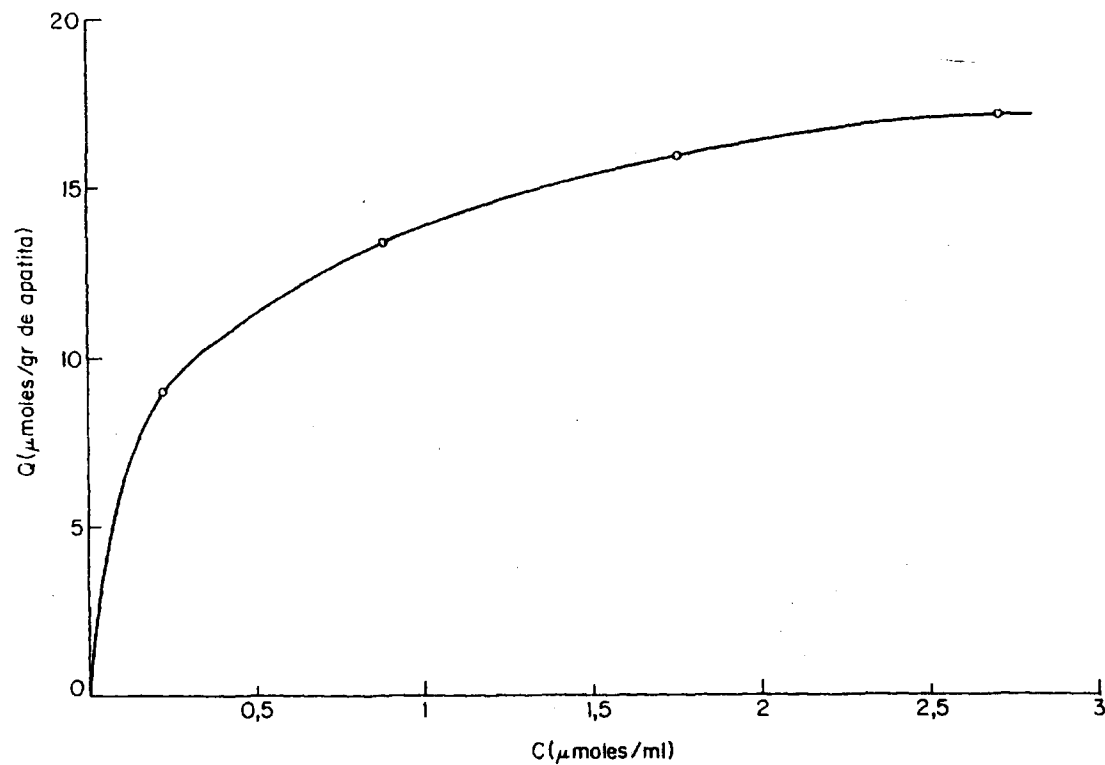


Fig. 25 .- Isotherma de adsorción del ácido L-glutámico adsorbido sobre hidroxil-apatita no estequiométrica.

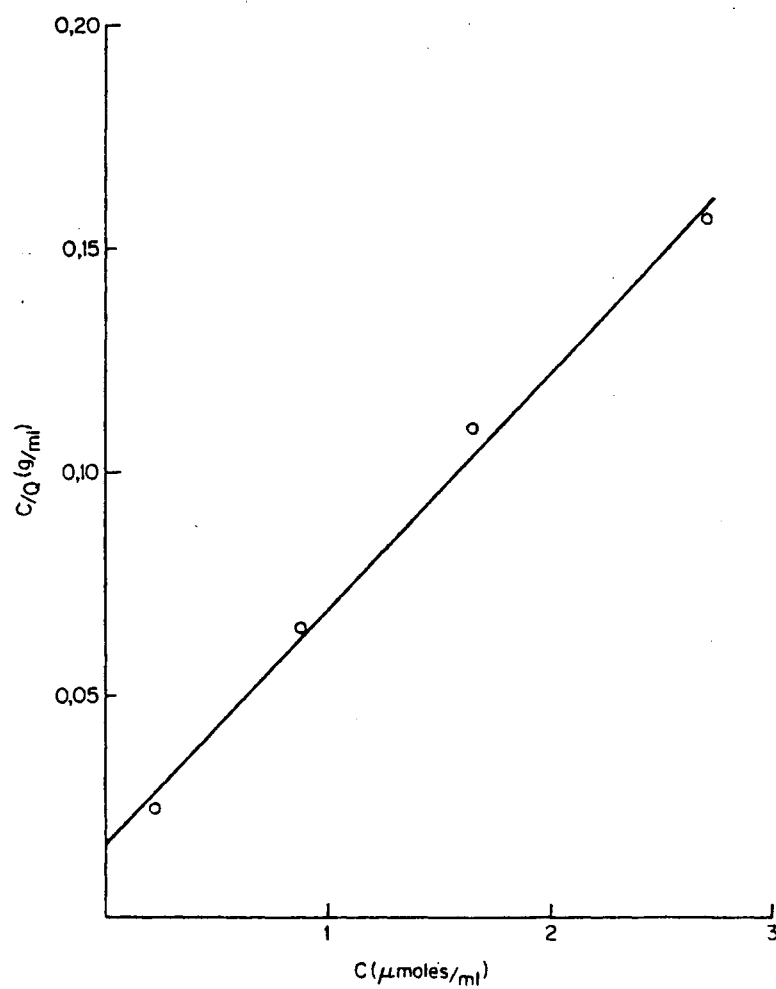


Fig. 26.- Isotherma de adsorción del ácido L-glutámico adsorbido sobre hidroxil-apatita no estequiométrica.

y N el número máximo de sitios de adsorción por gramo de adsorbente. Los valores de Ci, C, Q, C/Q, K y N se presentan en la tabla 8, en la que se incluyen también los coeficientes de las regresiones lineales individuales para indicar el acuerdo de los resultados experimentales con la ecuación de Langmuir (10) (38).

5.3.2.1.- Espectros infrarrojos de las muestras calcinadas

Los espectros infrarrojos de muestras calcinadas de apatita cálcica y de este compuesto conteniendo aminoácido adsorbido se incluyen en las figuras 27 y 28. En ellas se pone de manifiesto que la banda a 715 cm^{-1} , correspondiente al pirofosfato cálcico, prácticamente desaparece cuando se trata de una muestra de apatita sobre la que se ha adsorbido uno de estos dos aminoácidos.

5.3.2.2.- Superficies específicas

Se han medido las superficies específicas de apatita pura y de este producto conteniendo aminoácido adsorbido. En el primer caso el resultado obtenido fue $70\text{ m}^2/\text{g}$, y para el ión aspártato adsorbido sobre la apatita $203.7\text{ m}^2/\text{g}$. Como el volumen ocupado por los ácidos L-aspártico y L-glutámico es mayor que el de los iones fosfato de la hidroxil-apatita, una sustitución de los aniones inorgánicos por los orgánicos adoptando estos últimos unas orientaciones determinadas sobre la superficie apatítica elevaría considerablemente la superficie específica. Los resultados obtenidos parecen confirmar esta hipótesis.

5.3.2.3.- Medida de las relaciones Ca/P

Tabla 8 .- Isotermas de adsorción de los ácidos L-aspártico y L-glutámico sobre hidroxil-apatita no estequiométrica.

Acido L-aspártico				Acido L-glutámico			
C_i	C	Q	C/Q	C_i	C	Q	C/Q
($\mu\text{moles/ml}$)	($\mu\text{moles/ml}$)	($\mu\text{moles/g}$)	(g/ml)	($\mu\text{moles/ml}$)	($\mu\text{moles/ml}$)	($\mu\text{moles/g}$)	(g/ml)
1.54	0.77	7.64	0.10	1.11	0.22	8.96	0.03
3.07	1.91	11.45	0.17	2.22	0.88	13.37	0.07
4.60	3.20	13.91	0.23	3.33	1.75	15.82	0.11
6.14	4.48	16.46	0.27	4.44	2.71	17.24	0.16

$$K = 0.638 \text{ ml}/\mu\text{mol}$$

$$N = 21.60 \text{ } \mu\text{moles/g}$$

$$r \text{ (coeficiente de regresión)} = 0.9960$$

$$K = 0.694 \text{ ml}/\mu\text{mol}$$

$$N = 18.94 \text{ } \mu\text{moles/g}$$

$$r \text{ (coeficiente de regresión)} = 0.9952$$

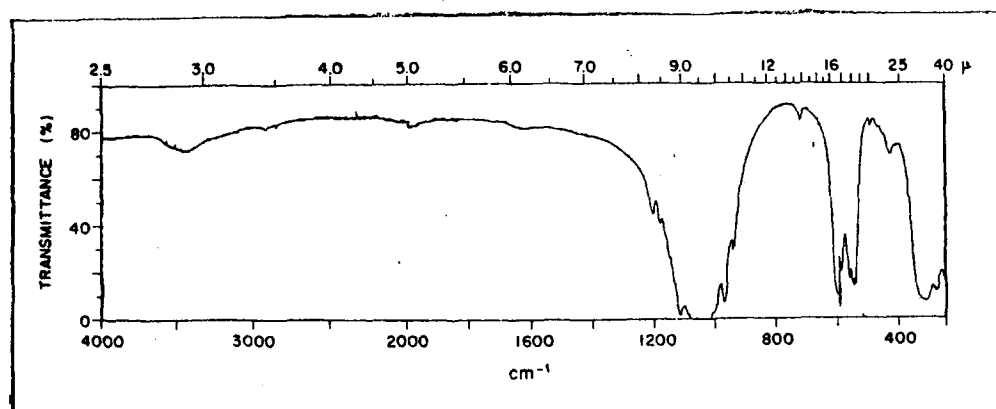


Fig. 27.- Espectro IR de la hidroxil-apatita no estequiométrica calcinada 2 horas a 800° C.

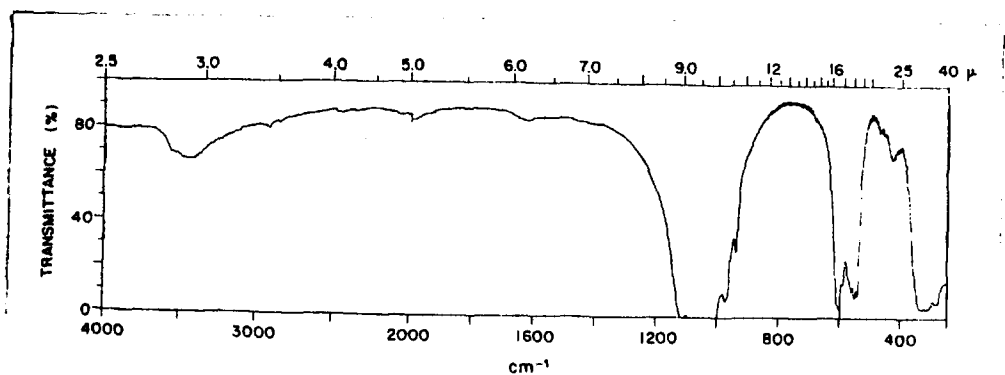


Fig. 28 .- Espectro IR de la hidroxil-apatita con ácido L-aspartico adsorbido, calcinada 2 horas a 800° C.

Análogamente, se han determinado la relación Ca/P, átomo-gramo, para la apatita pura y para este producto conteniendo aminoácido adsorbido. Los valores correspondientes resultaron ser 1.42 y 1.59 para la hidroxil-apatita y el mismo compuesto conteniendo ácido-L-aspartico, respectivamente. Este aumento de la relación Ca/P tras la adsorción sobre hidroxil-apatita es coherente con la hipótesis de la sustitución de aniones fosfato por los del aminoácido, como señalamos en el apartado anterior.

5.3.3.- L-arginina

Para interpretar los resultados obtenidos en la adsorción de esta sustancia sobre la hidroxil-apatita, hemos abordado, primeramente, el problema de asignar las principales bandas de adsorción de este aminoácido en la región $4000-1300\text{ cm}^{-1}$, dado que no existen a este respecto antecedentes en la literatura.

Por ello nos hemos basado en la aproximación de considerar el espectro de la L-arginina como la superposición de las bandas correspondientes, al grupo guanidinio y al resto α -aminoácido de la molécula.

Partiendo de esta aproximación, hemos realizado la asignación recurriendo a los desplazamientos que sufren las bandas de absorción infrarroja de esta sustancia en sólido cuando se disuelve en D_2O a $\text{pH}=7.5$, y comparando los espectros obtenidos por nosotros con los publicados en la bibliografía para el ión guanidinio (39) y para el

resto de la molécula (37) (40).

En las figuras 29 y 31 están representados los espectros de esta sustancia como sólido anhidro y en disolución en agua pesada. La banda del compuesto sólido situada hacia 1678 cm^{-1} no aparece en disolución en D_2O y la hemos asignado a la vibración de valencia $\nu(\text{C}=\text{O})$ del grupo carboxilo. Igualmente sucede con las situadas hacia 1630 y 1560 cm^{-1} que hemos asignado, respectivamente, a las vibraciones $\nu(\text{C}=\text{NH}_2)$ del grupo guanidinio y $\delta(\text{NH}_3^+)$.

La primera de ellas se desplaza, mediante deuteración en D_2O hacia 1575 cm^{-1} como sucede con el ión guanidinio (39). La segunda se sitúa en el rango de frecuencias en que aparece este tipo de vibración de acuerdo con la literatura (37) (40). Finalmente, tanto en el espectro de esta sustancia en sólido como en disolución en D_2O , se hacen visibles dos bandas hacia 1620 y 1518 cm^{-1} y, por lo tanto, las hemos asignado a las vibraciones de valencia asimétrica y simétrica del grupo carboxilato (COO^-), respectivamente.

La figura 30 muestra el espectro infrarrojo de la L-arginina adsorbida sobre la hidroxil-apatita. Sobre la banda debida a la vibración de deformación del agua apatítica (1635 cm^{-1}) aparece un hombro hacia 1620 cm^{-1} correspondiente a la vibración de valencia asimétrica del grupo carboxilato. La vibración de valencia simétrica del mismo grupo también aparece hacia 1420 cm^{-1} , así como la banda $\delta(\text{NH}_3^+)$ situada a 1515 cm^{-1} , y la $\nu(\text{N}-\text{H})$ a 3185 cm^{-1} del grupo guanidinio y/o NH_3^+ .

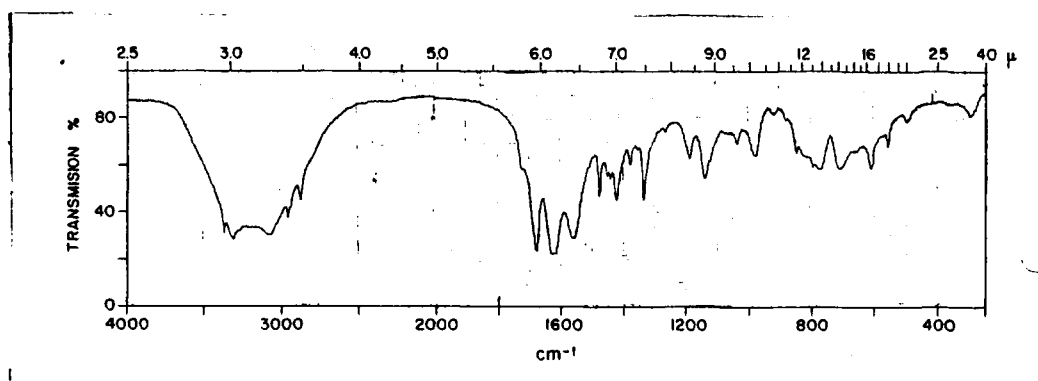


Fig. 29 .- Espectro IR de la L-arginina en BrK.

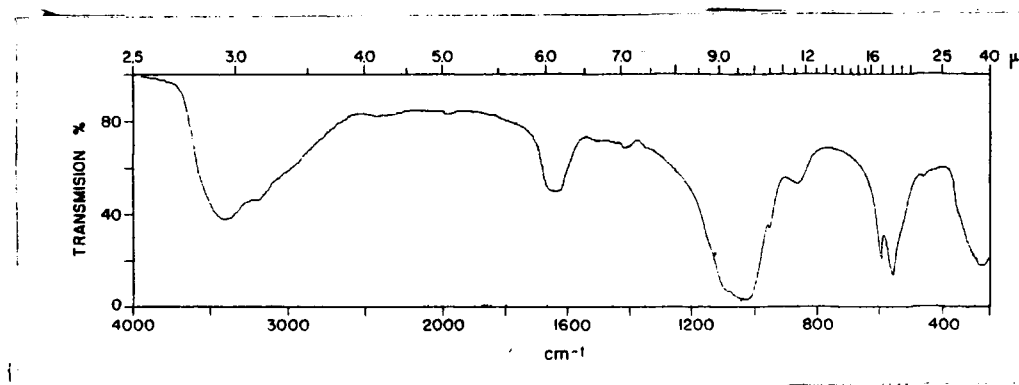


Fig. 30 .- Espectro IR de la hidroxil-apatita no estequiométrica con L-arginina adsorbida, en BrK.

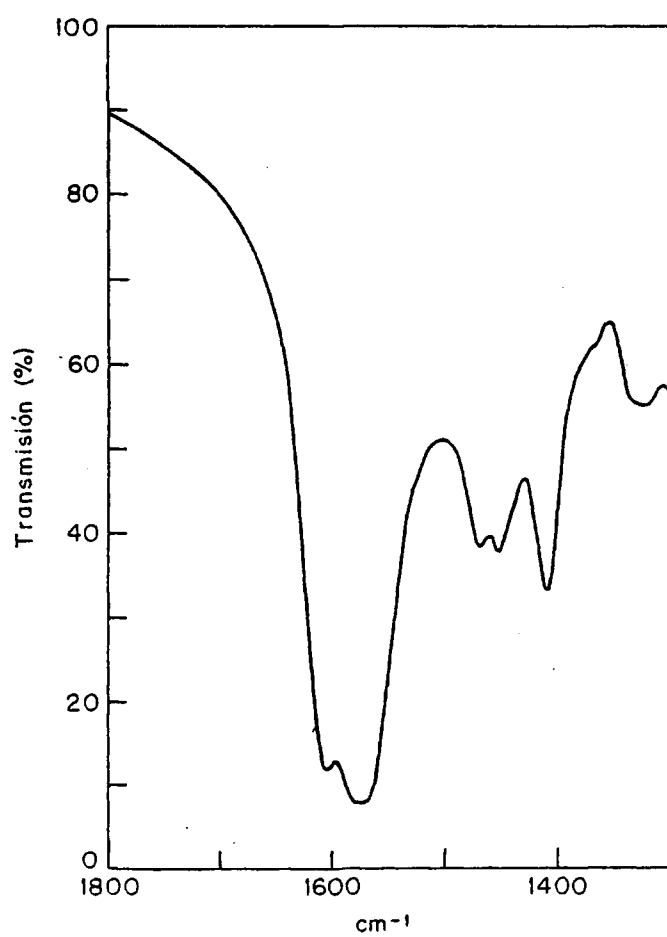


Fig. 31 .- Espectro IR de la L-arginina en D_2O ($l=0.025$ mm).

En la tabla 9 se dan los valores de C_i , Q , C y C/Q correspondientes a la adsorción de esta sustancia sobre hidroxil-apatita, los cuales están representados en las figuras 32 y 33. Como es fácil observar en la figura 33 existe una dispersión considerable entre los valores obtenidos que no se ajustan a la ecuación de Langmuir. Por otra parte y mediante la comparación de la tabla anteriormente citada con la tabla 9 se advierte que para concentraciones iniciales muy próximas, la cantidad de adsorbato por gramo de hidroxil-apatita es menor en el caso de la adsorción de L-arginina.

5.3.3.1.- Espectro infrarrojo de la muestra calcinada

En la figura 34 se presenta el espectro infrarrojo de una muestra de hidroxil-apatita no estequiométrica calcinada por encima de 800°C . En dicha figura puede observarse la ausencia de la banda 715 cm^{-1} , correspondiente al pirofosfato cálcico, de forma análoga a lo que sucedía en el caso de la adsorción de los ácidos L-aspartico y L-glutámico.

5.3.3.2.- Superficies específicas

Se ha medido la superficie específica de la hidroxil-apatita no estequiométrica conteniendo L-arginina adsorbida, cuyo valor es $89.57\text{ m}^2/\text{g}$.

5.3.3.3.- Medidas de las relaciones Ca/P

Análogamente, se ha determinado la relación Ca/P, átomo-gramo, para la hidroxil-apatita conteniendo L-arginina. La relación resultó ser de 1.12, inferior al valor teórico de 1.50 obtenido para una hidroxil-apatita de $x=1$, usada en este trabajo.

Tabla 9 .- Isotherma de adsorción de la L-arginina sobre hidroxil-apatita no estequiométrica.

C_i	C	Q	C/Q
($\mu\text{moles/ml}$)	($\mu\text{moles/ml}$)	($\mu\text{moles/g}$)	(g/ml)
1.00	0.74	2.56	0.29
1.50	1.02	4.80	0.21
2.00	1.59	4.10	0.39
2.50	1.93	5.75	0.34
3.00	2.21	7.93	0.28
4.00	2.87	11.13	0.26

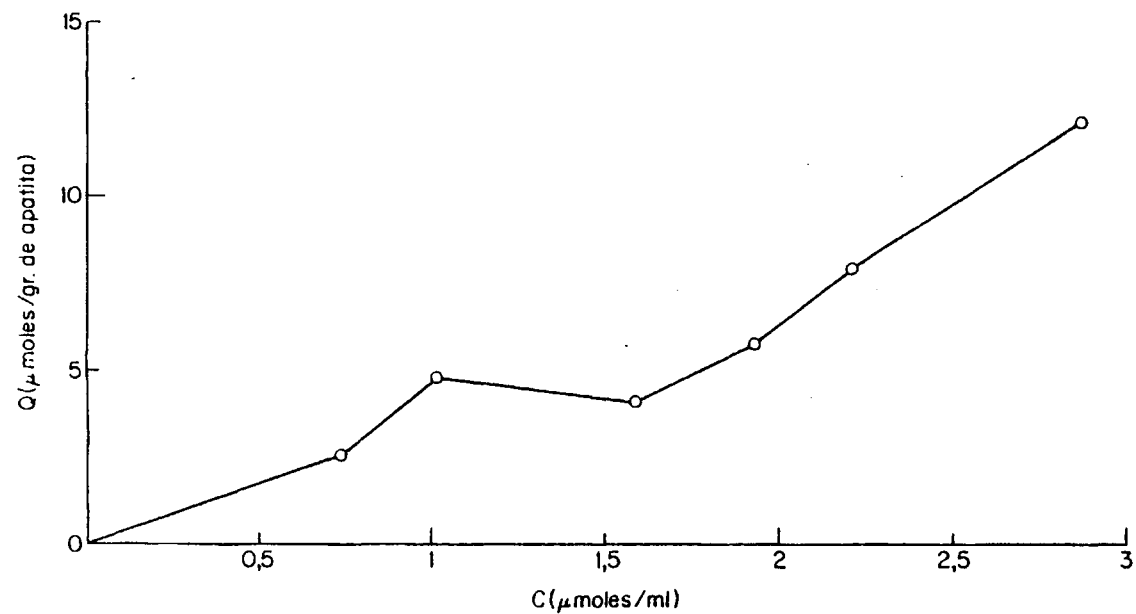


Fig. 32.- Isotherma de adsorción de la L-arginina adsorbida sobre hidroxil-apatita no estequiométrica.

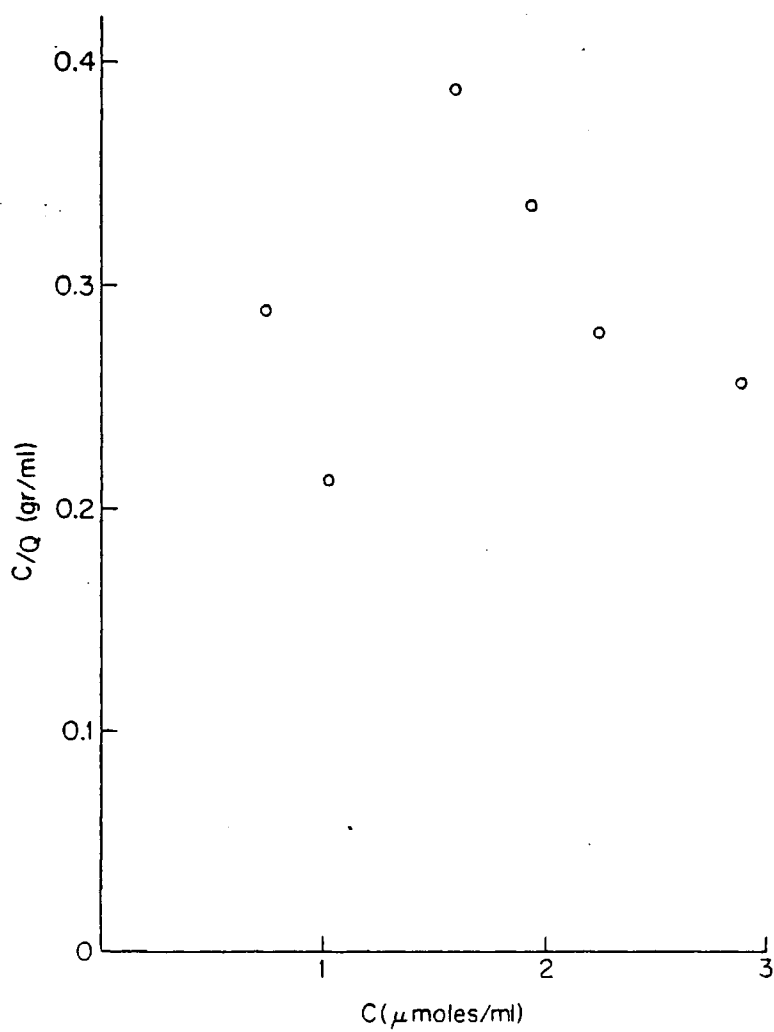


Fig. 33.- Isoterma de adsorción de la L-arginina adsorbida sobre hidroxil-apatita no estequiométrica.

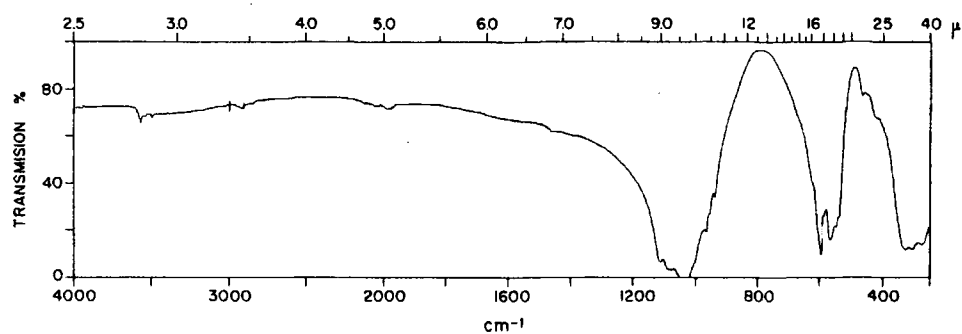


Fig. 34 .- Espectro IR de la hidroxil-apatita no estequiométrica con L-arginina adsorbida, calcinada 2 horas a 800° C.

5.3.4.- Homopéptidos

5.3.4.1.- Poli-glicina

Esta sustancia es ligeramente soluble en disoluciones acuosas saturadas de BrLi. Por esta razón, una vez adsorbido el polímero, hemos procedido a lavar la mezcla, adsorbente más adsorbato, varias veces con agua, con el fin de eliminar el bromuro de litio de la hidroxil-apatita. Como el ión calcio posee una relación carga/radio mayor que el ión Li^+ (28), la hidroxil-apatita tenderá más que el bromuro de litio a retener la poli-glicina. Pero aún así se pierde adsorbato y por ello, el espectro IR de esta sustancia adsorbida sobre la hidroxil-apatita (figura 35) sólo muestra las bandas más intensas. Así, la banda amida I aparece en este caso a 1610 cm^{-1} , es decir, a frecuencia más baja que la de la misma vibración para la sustancia en sólido (41). Por su proximidad con la frecuencia de esta misma banda cuando la poli-glicina se disuelve en disoluciones saturadas de haluros alcalinos (42), parece deducirse una interacción del grupo peptídico con los iones cálcicos superficiales de manera análoga a lo que ocurre en la adsorción de N-metil acetamida sobre la hidroxil-apatita, aunque en el caso de la poli-glicina intervendrán, probablemente factores conformacionales de la cadena polipeptídica. En la región $3300\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ aparece un hombro correspondiente a la vibración $\nu(\text{N-H})$.

5.3.4.2.- Acido poli-L-aspártico

En las figuras 36a y 36b se muestran los espectros infrarrojos del ácido poli-L-aspártico en disolución de agua pesada a pH 8 y adsorbido sobre la apatita, respectivamente. De la comparación de ambos espectros se advierte, como nota más característica un despla

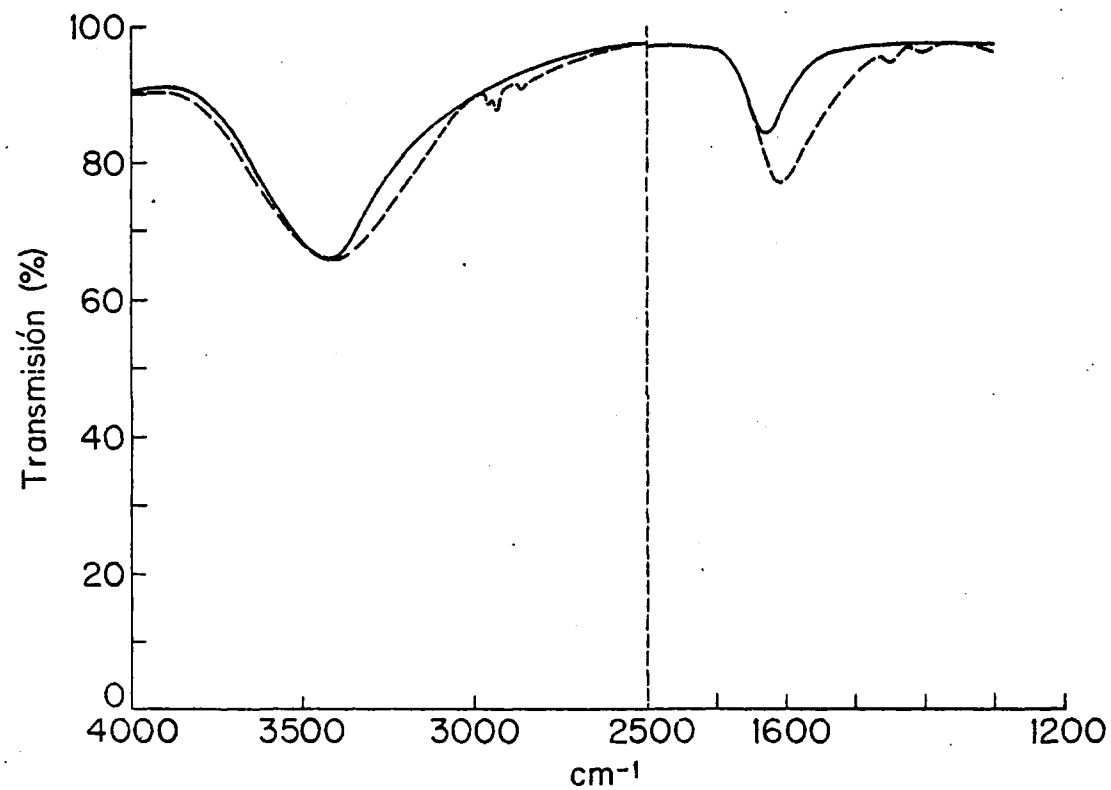


Fig. 35 .- Espectro IR de la hidroxil-apatita no estequiométrica sola (—) y con poli-glicina adsorbida (- - -). (Films policristalino sobre F_2Ca).

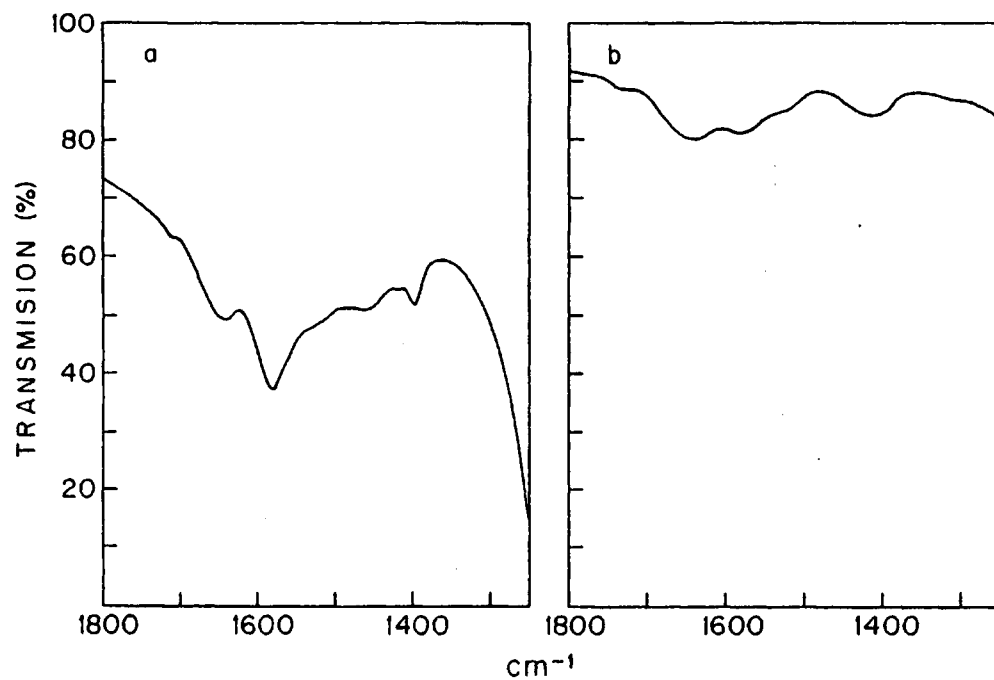


Fig. 36 .- a) Espectro IR del ácido poli-L-aspártico en D₂O (l=0.025 mm). b) Espectro IR del ácido poli-L-aspártico adsorbido sobre hidroxil-apatita no estequiométrica, en BrK.

zamiento de la banda de vibración de tensión simétrica del grupo carboxilato hacia frecuencias más altas, análogamente a lo que sucede para el ácido asártico y el ácido glutámico.

5.3.4.3.- Acido poli-L-glutámico

Los espectros infrarrojos correspondientes al ácido poli-L-glutámico adsorbido sobre la apatita y a diferentes humedades relativas se incluyen en las figuras 37, 38 y 39. Por otra parte, como términos de comparación, la figura 40 muestra los espectros infrarrojos de un film de ácido poli-L-glutámico, a las mismas humedades relativas que en el caso anterior, y finalmente las figuras 41 y 42 incluyen los espectros infrarrojos del poli-L-glutamato cálcico a 0% de humedad relativa, y del ácido poli-L-glutámico a pH 7.5 en D_2O .

Las conformaciones de las cadenas polipeptídicas se pueden determinar mediante las posiciones de sus bandas de absorción infrarroja (23) (25) (41-47). El espectro de la figura 40a (tabla 10) que ha sido registrado a una humedad relativa del 0% aproximadamente, (en presencia de P_2O_5) indica que el ácido poli-L-glutámico adopta, en este caso, una estructura β , pues su banda amida I aparece hacia 1608 cm^{-1} (44). También se hace visible una banda débil hacia 1690 cm^{-1} , que suele aparecer en los polipéptidos con esta estructura. Cuando la humedad relativa a que está sometido el film es del orden del 51% (nitrato cálcico)

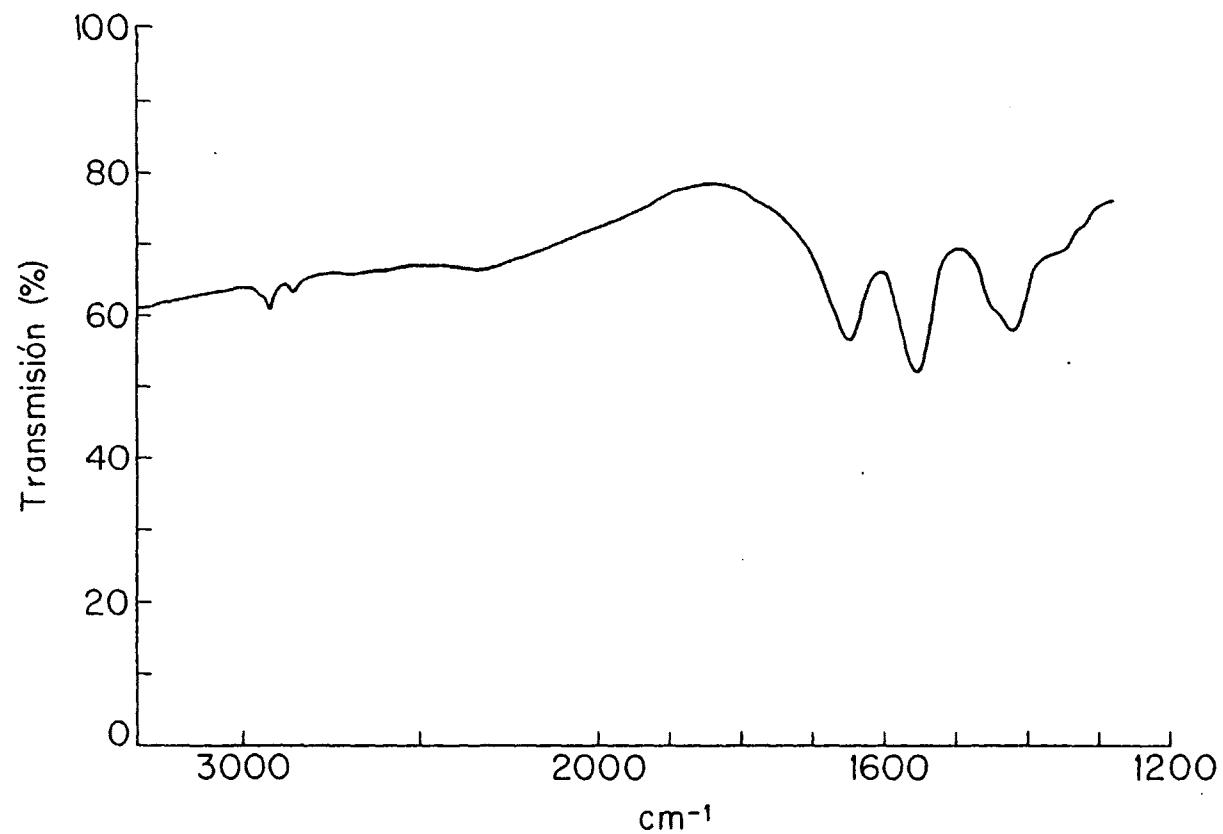


Fig. 37 .- Espectro IR del ácido poli-L-glutámico N-deuterado, adsorbido sobre hidroxil-apatita al 0% de humedad relativa.

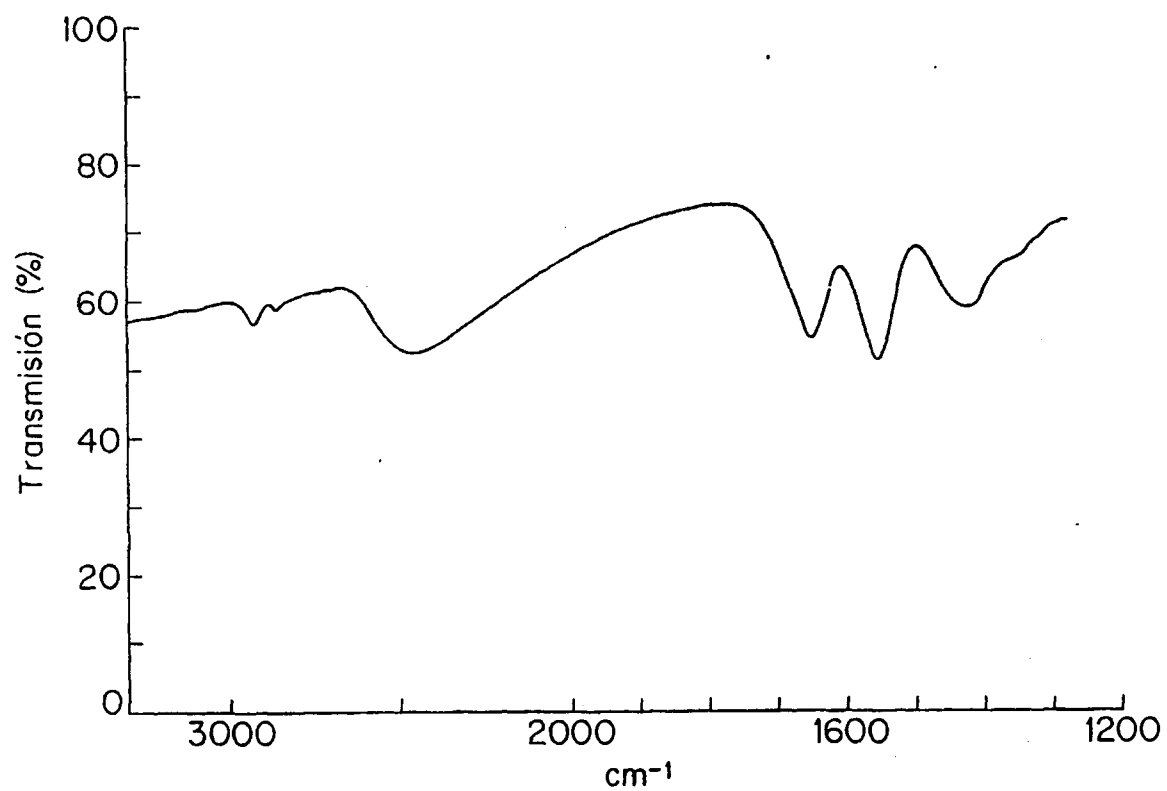


Fig. 38 .- Espectro IR del ácido poli-L-glutámico N-deuterado adsorbido sobre hidroxil-apatita al 51% de humedad relativa.

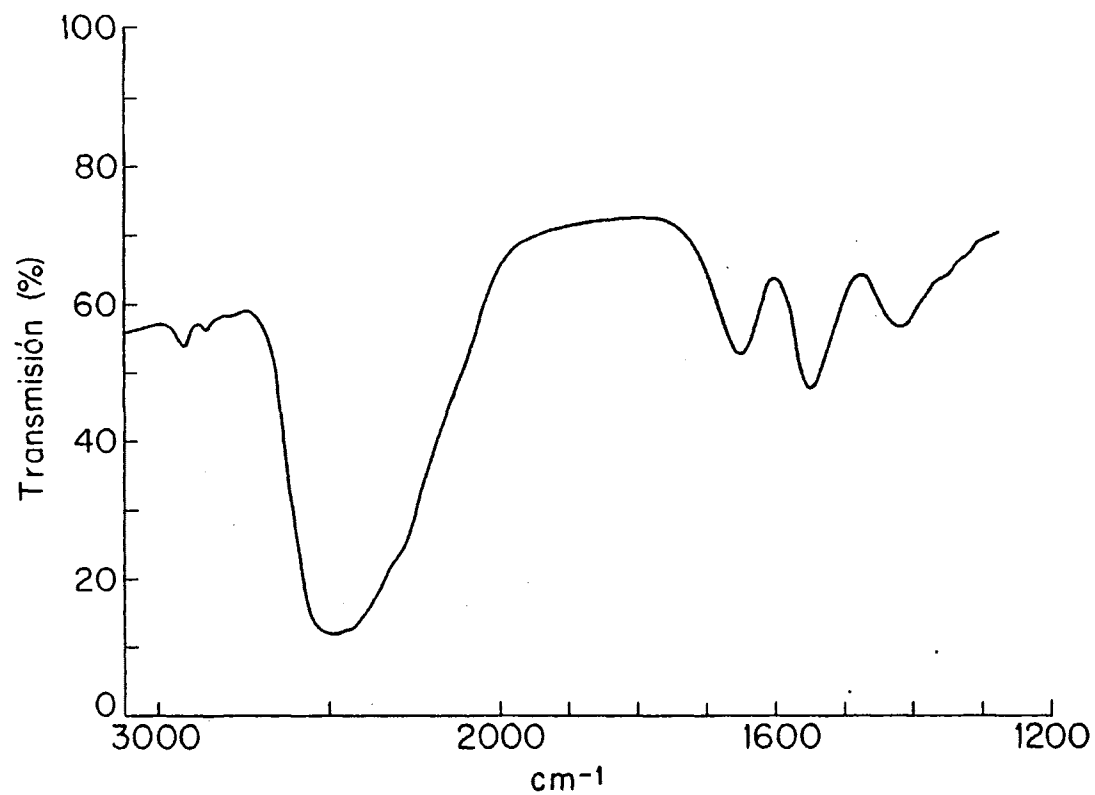


Fig. 39.- Espectro IR del ácido poli-L-glutámico N-deuterado adsorbido sobre hidroxil-apatita al 84% de humedad relativa.

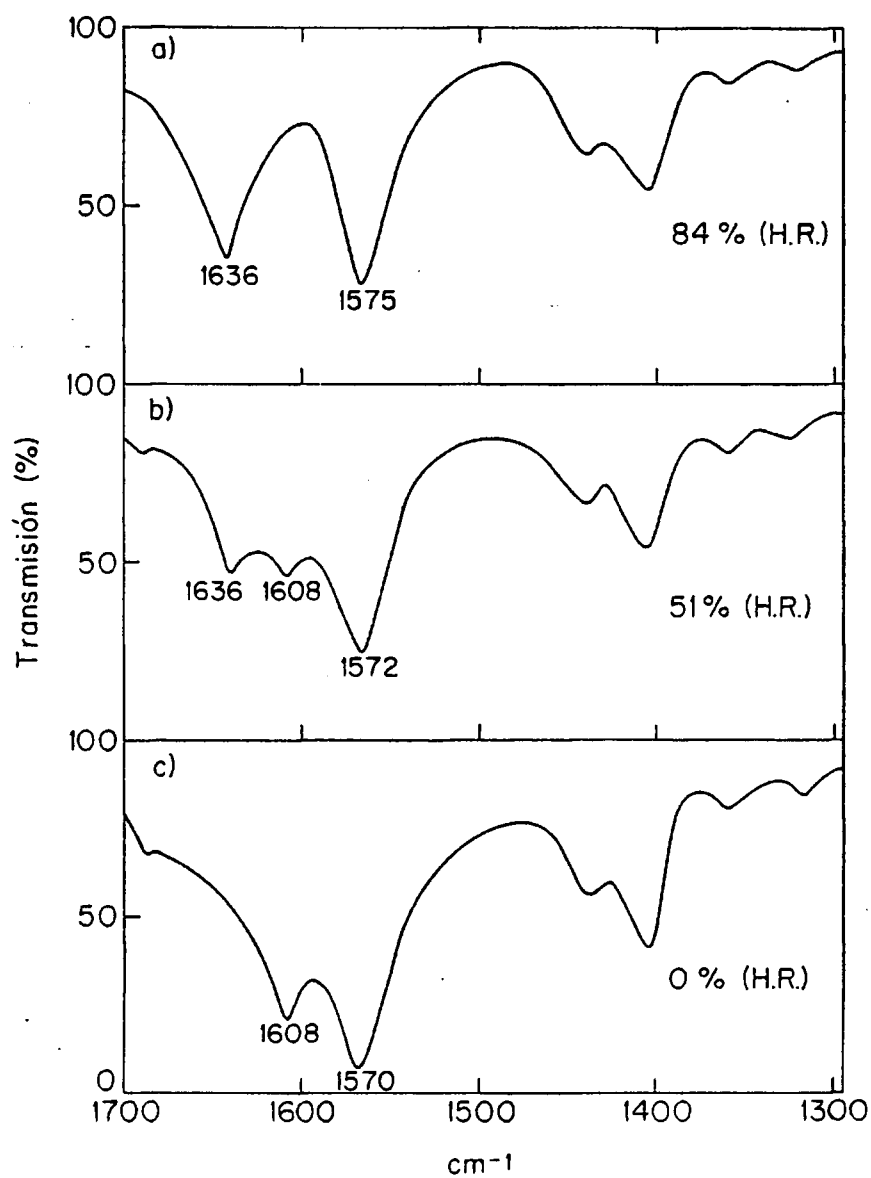


Fig. 40.- Espectro IR del ácido poli-L-glutámico N-deuterado a distintas humedades relativas.

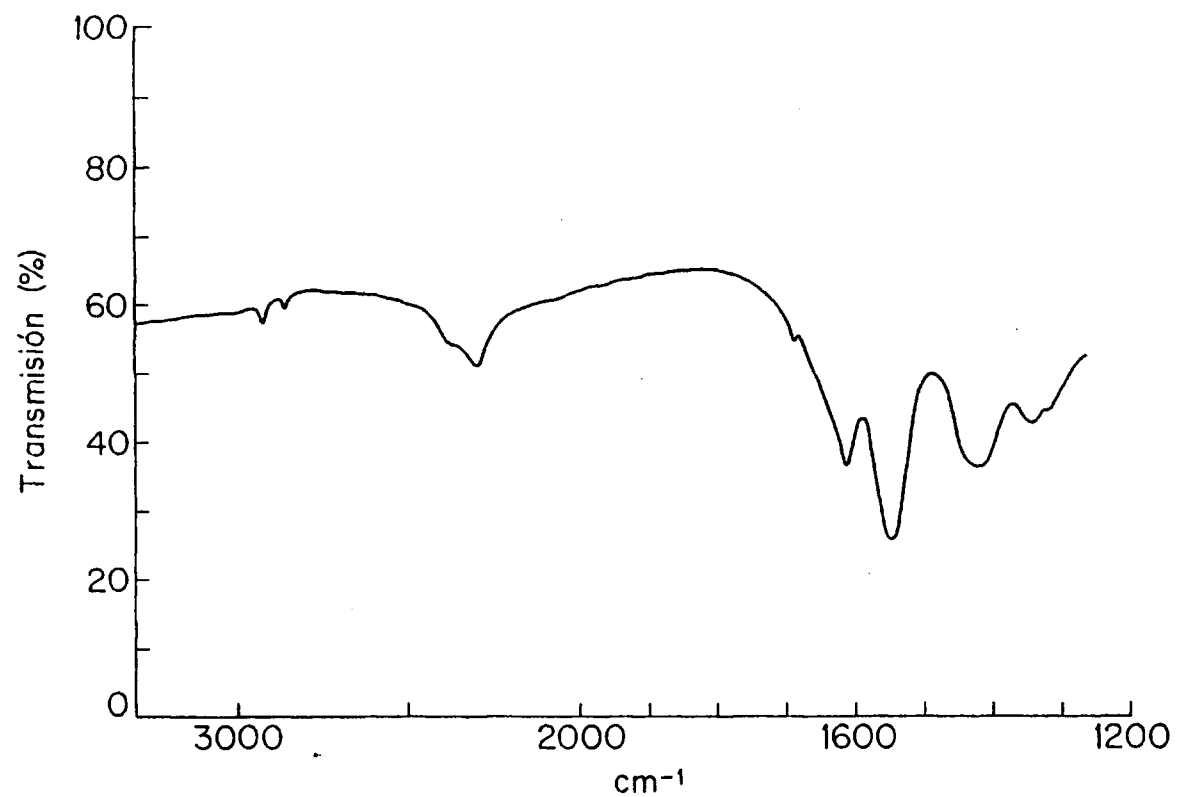


Fig. 41.- Espectro IR del poli-L-glutamato cálcico N-deuterado al 0% de humedad relativa.

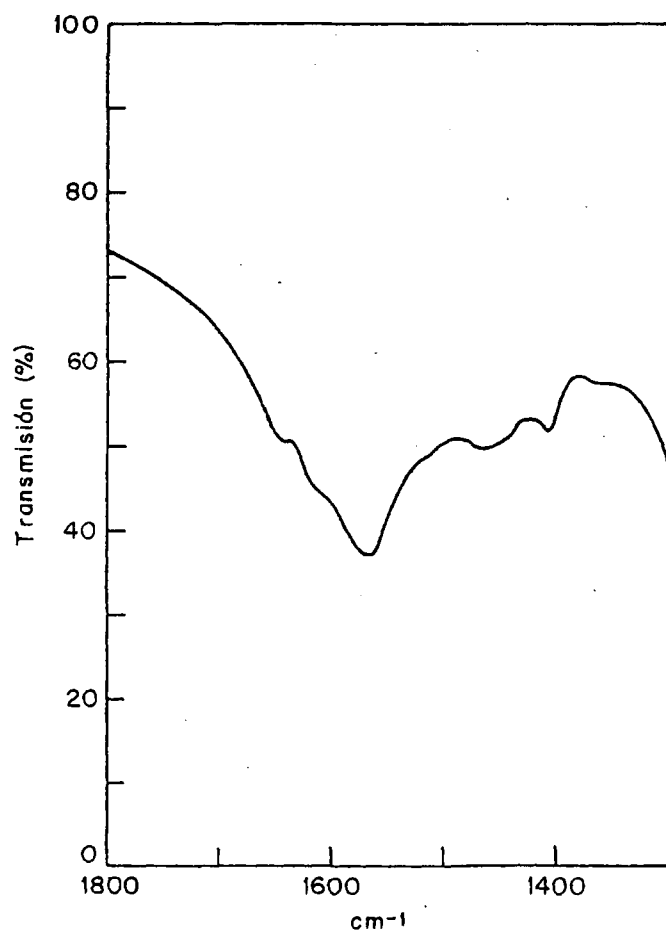


Fig. 42 .- Espectro IR del ácido poli-L-glutámico en D₂O (l=0,025 mm).

Tabla 10.- Números de ondas (cm^{-1}) del ácido poli-L-glutámico a diferentes humedades relativas, adsorbido sobre la hidroxil-apatita y de su sal cálcica.

	Poli-L-glutamato cálcico (0%)	Acido poli-L- glutámico (0%)	Acido poli-L- glutámico (51%)	Acido poli-L- glutámico (84%)	Acido poli-L-glutá- mico + Hidroxil-apatita
Amida I	1612	1608	1636 1608	1636	1650
ν_{as} (COO^-)	1550	1570	1572	1575	1555
ν_{s} (COO^-)	1428	1408	1408	1406	1425

(figura 40b), la estructura β parece coexistir con otra que da lugar a una banda de absorción infrarroja a 1636 cm^{-1} . Esta banda la hemos atribuido a una estructura α por concordar con los resultados de la literatura (47) y sobre la base de que el espectro infrarrojo de esta sustancia en disolución de D_2O a $\text{pH} \sim 7.5$ (figura 42) da origen a una banda amida I situada a frecuencias superiores (hacia 1645 cm^{-1}). En este último caso, la estructura adoptada por el polímero es, globalmente, desordenada (47) (48). Finalmente, cuando la humedad relativa del film es del 84% (figura 40c), el polímero en cuestión parece adoptar predominantemente la estructura α . Estas transiciones conformacionales, dependientes de la humedad relativa, tienen lugar de una manera reversible.

El espectro infrarrojo del poli-L-glutamato cálcico N-deuterado (figura 41) parece corresponder a una estructura β , de acuerdo con los estudios cristalográficos (22) (49) y con la posición de sus bandas amida I a 1612 cm^{-1} y otra débil hacia 1690 cm^{-1} .

Cuando el ácido poli-L-glutámico está adsorbido sobre la hidroxil-apatita (figuras 37, 38 y 39), la posición de la banda amida I no parece corresponder a una estructura β . Por otra parte la proximidad que siempre existe entre las frecuencias de las bandas amida I en las estructuras α y desordenada (42) hace difícil distinguirlas mediante el uso exclusivo de la espectroscopía infrarroja. Sin embargo, algunas características de los espectros infrarrojos de esta sustancia adsorbida sobre la hidroxil-apatita, parecen apoyar una estructura localmente ordenada que es la que existe en

disolución acuosa a pH superior a 5. (48). A ello nos referimos más adelante, en la discusión de esta memoria.

De la comparación de los espectros que representan las figuras 37, 38 y 39 se advierte una permanencia de las frecuencias correspondientes a las bandas más intensas, amida I (hacia 1650 cm^{-1}) y asimétrica de tensión $\nu_{as}(\text{COO}^-)$, alrededor de 1555 cm^{-1} . Además esta última banda se sitúa a una frecuencia muy próxima a la del modo correspondiente en el poli-L-glutamato de calcio a 1550 cm^{-1} . Análogamente, tanto la banda $\nu_s(\text{COO}^-)$ en la sal cálcica de este polímero como la correspondiente al mismo modo del ácido poli-L-glutámico adsorbido sobre la hidroxil-apatita se encuentran a frecuencias muy próximas (hacia 1425 cm^{-1}). La correspondiente vibración, $\nu_s(\text{COO}^-)$ del polímero en disolución acuosa (figura 42) sufre, pues, desplazamientos similares hacia frecuencias más altas cuando el polímero en cuestión se une al calcio para formar su sal correspondiente ó cuando se adsorbe sobre la hidroxil-apatita.

Por otro lado, al considerar los espectros de la figura 40 se advierte un desplazamiento de las bandas anteriormente citadas, lo que corresponde al un reordenamiento o cambio conformacional de las moléculas del polímero, como se indicará en la discusión de este trabajo. La atribución de las bandas correspondientes al espectro infrarrojo de estas sustancias la hemos realizado por comparación con los espectros publicados en la literatura (23)(25)(42)(50).

5.3.5.- Difracción de rayos X a bajo ángulo

Las curvas densitométricas del difractograma obtenido a partir de una muestra de hidroxil-apatita conteniendo ácido-poli-L-aspartico adsorbido y del difractograma correspondiente a una muestra apatítica de un cálculo renal se incluyen en las figuras 43 y 44 respectivamente. Como término de comparación se muestra asimismo en la figura 45 la curva densitométrica para una muestra sintética de hidroxil-apatita pura.

La determinación de la distancia interplanar o periodicidad del polímero se ha realizado, a partir de los difractogramas, de la siguiente manera:

En la figura 46 se observa la relación existente entre el radio de los anillos de la placa r y el ángulo de difracción θ conociendo previamente la longitud de la cámara l :

$$\operatorname{tg} 2\theta = \frac{r}{l} \quad (24)$$

En nuestro caso, la longitud de la cámara es de 200 mm por lo que $\theta = 1/2 \operatorname{arc} \operatorname{tg} r/200$.

La longitud de onda de la radiación empleada ha sido 1.54 \AA . Según la fórmula de Bragg: $d = \lambda / (2 \cdot \operatorname{sen} \theta) = 1.54 / (2 \cdot \operatorname{sen} \theta)$ y por consiguiente, los resultados obtenidos han sido 10.35 \AA , para una muestra apatítica de un cálculo renal, y 19.29 \AA para una muestra de apatita sintética conteniendo ácido poli-L-aspartico adsorbido.

5.3.6.- Microscopía electrónica

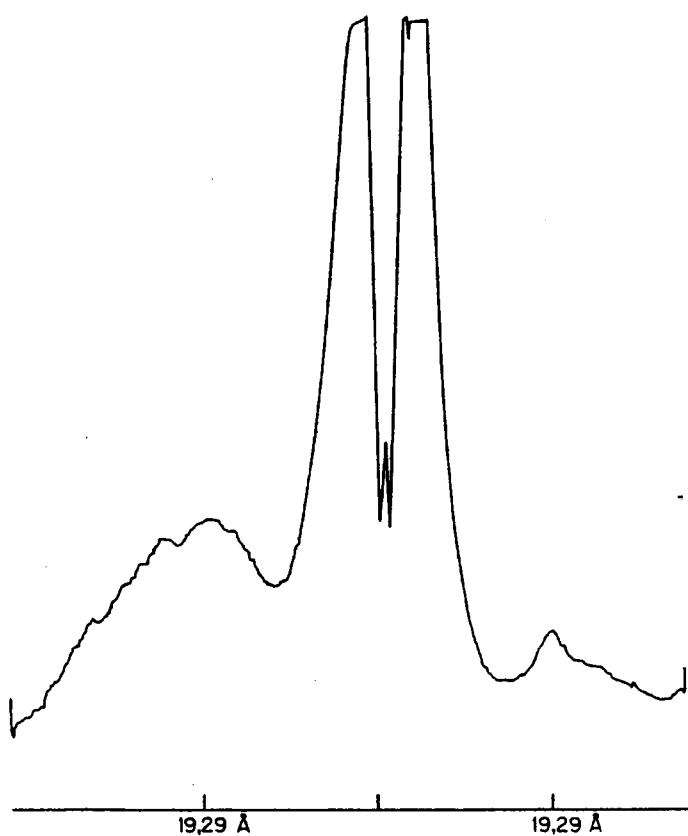


Fig. 43 .- Curva densitométrica de la difracción de Rayos X a bajo ángulo de la hidroxil-apatita no estequiométrica con ácido poli-L-aspártico adsorbido.

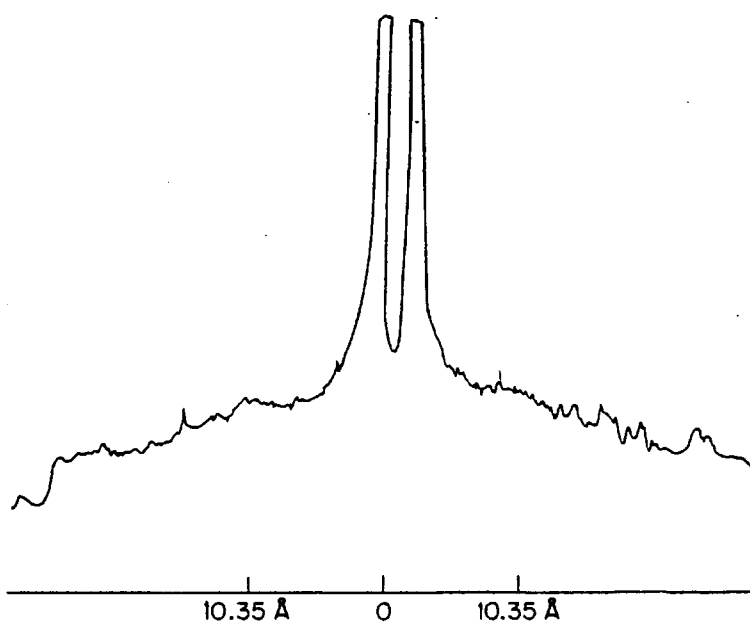


Fig. 44 .- Curva densitométrica de la difracción de Rayos X a bajo ángulo de un cálculo renal apatítico.

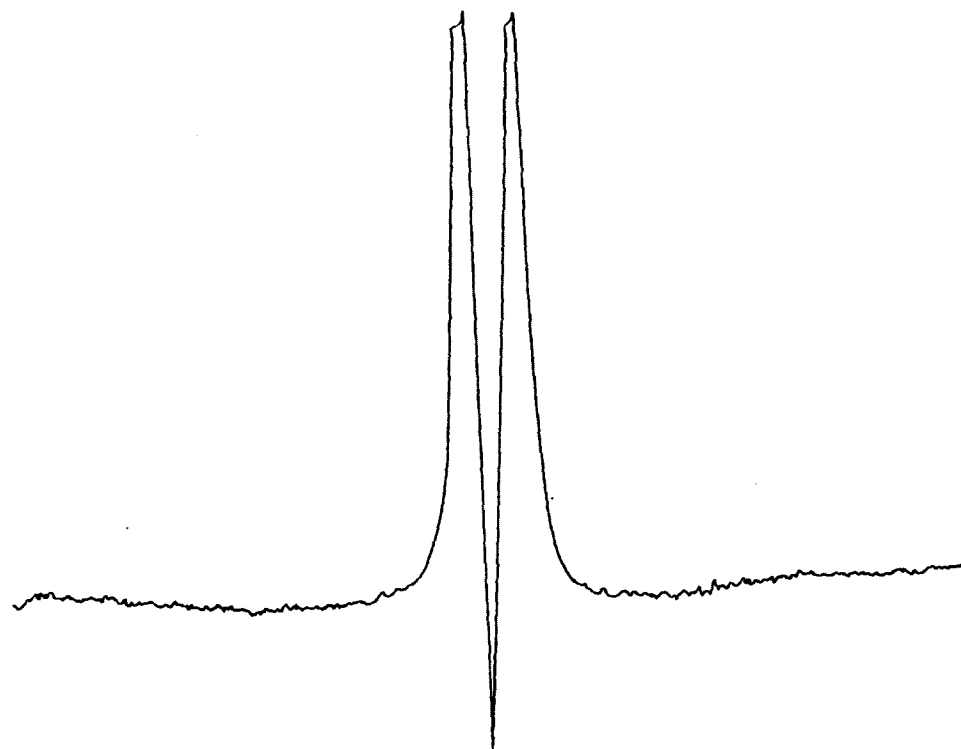


Fig. 45 .- Curva densitométrica de la difracción de Rayos X a bajo ángulo de la hidroxilapatita no estequiométrica.

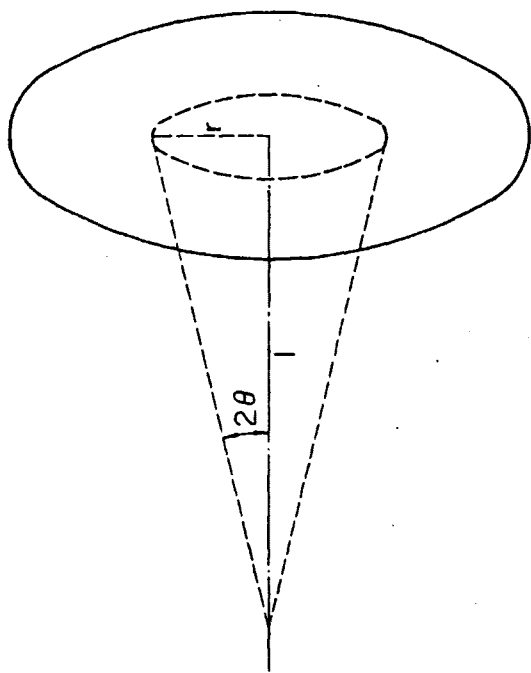


Figura 46

Las figuras 47, 48 y 49 representan las estructuras obtenidas obtenidas mediante microscopía electrónica, de una muestra apatítica de un cálculo renal. Análogamente se han estudiado las estructuras morfológicas de unas muestras sintéticas de apatita sobre las que se ha adsorbido ácido poli-L-aspartico (figuras 50, 51 y 52), poli-glicina (figuras 53 y 54), ácido L-aspartico (figura 55), y finalmente se ha considerado la estructura de una muestra sintética de hidroxil-apatita no estequiométrica pura (figura 56).

En el caso de la muestra procedente del cálculo renal, se aprecian unidades U_1 (15) distribuidas al azar (figura 47). Cada una de estas unidades comporta otras subunidades U_2 que se ponen de manifiesto en las figuras 48 y 49. Estas subunidades, puede apreciarse en dichas figuras que están regularmente organizadas, disponiéndose paralelamente unas con respecto a otras. Estructuras análogas se aprecian para el caso de las muestras de hidroxil-apatita sintética conteniendo ácido poli-L-aspartico adsorbido. (figuras 50, 51 y 52).

Cuando la apatita contiene poli-glicina adsorbida, aparecen otras estructuras en forma de agregados policristalinos de morfología irregular (figuras 53 y 54). Estas estructuras son asimismo análogas a las observadas en el caso de la hidroxil-apatita no estequiométrica (figura 56) y de éste compuesto conteniendo ácido L-aspartico adsorbido. (figura 55).

5.3.7.- Crecimiento de cristales de hidroxil-apatita no estequiométrica.



Fig. 47.- Hidroxil-apatita no estequiométrica de un cálculo renal (22000x).



Fig. 48.- Hidroxil-apatita no estequiométrica de un cálculo renal (22000x).



Fig. 49.- Hidroxil-apatita no estequiométrica de un cálculo renal (150000x).



Fig. 50.- Hidroxil-apatita no estequiométrica con ácido Poli-L-aspártico adsorbido (30000x).



BIBLIOTECA

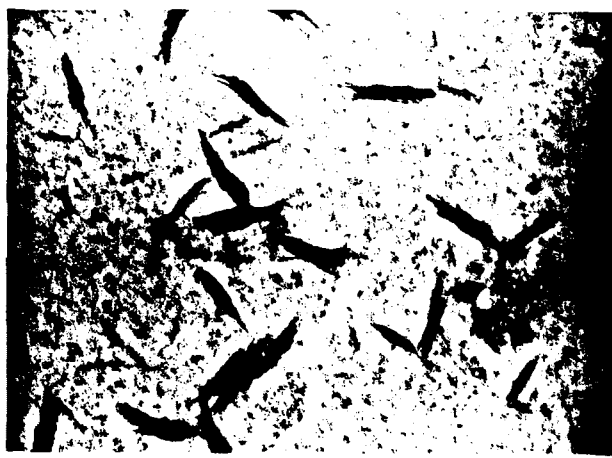


Fig. 51.- Hidroxil-apatita no estequiométrica con ácido poli-L-aspártico adsorbido (60000x).

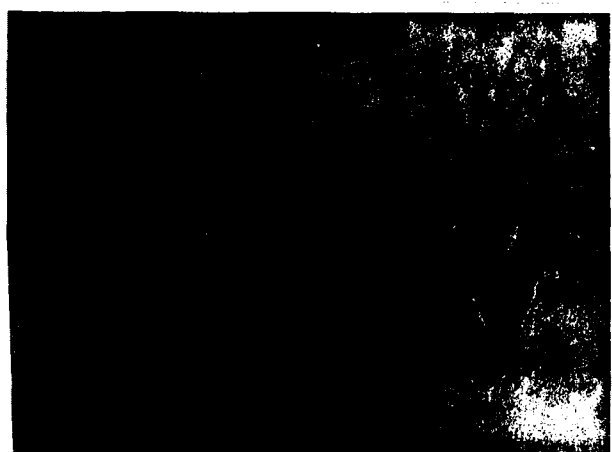


Fig. 52.- Hidroxil-apatita no estequiométrica con ácido poli-L-aspártico adsorbido (150000x).



Fig. 53.- Hidroxil-apatita no estequiométrica con poli-
glicina adsorbida (24000x).



Fig. 54.- Hidroxil-apatita no estequiométrica con poli-
glicina adsorbida (30000x).

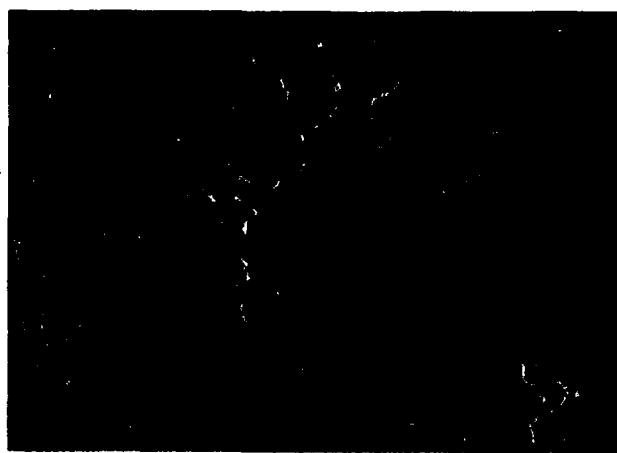


Fig. 55.- Hidroxil-apatita no estequiométrica con ácido L-aspártico adsorbido (22000x).



Fig. 56.- Hidroxil-apatita no estequiométrica (22000x).

En la tabla 11, se presentan las partes por millón (ppm) de Ca^{++} que contienen las suspensiones de hidroxil-apatita sometidas a crecimiento cristalino. Estos valores se han representado gráficamente en la figura 56.

Para estudiar la influencia de la estructura secundaria de las macromoléculas ensayadas, se ha realizado otro experimento de crecimiento de cristales de hidroxil-apatita y brushita en presencia de poli-L-glutámico y poliacrílico. Los resultados se muestran en la tabla 12 y gráficamente, en las figuras 57 y 58.

De la figura 56 se deduce que el ácido poli-L-glutámico inhibe con mayor eficacia el crecimiento de cristales de hidroxil-apatita siguiéndole los aminoácidos L-aspartico, L-glutámico y L-arginina, y, finalmente, la N-metil acetamida.

Por otra parte, de las figuras 57y 58 se deduce que en el caso del crecimiento de cristales de hidroxil-apatita, los ácidos poli-L-glutámico y poliacrílico lo inhiben en cierta medida. Sin embargo, al comparar este comportamiento con el de estas macromoléculas en el crecimiento de cristales de brushita, aparece una notable diferencia, debida a que el ácido poliacrílico inhibe ligeramente el crecimiento cristalino de la brushita.

Tabla 11.- Crecimiento cristalino de hidroxil-apatita. Partes por millón de calcio en disolución.

t (horas)	Hidroxil-apatita sola	Acido-L-aspártico-	Acido-L-glutámico-	L-arginina	N-metil acetamida	Acido poli-L-glutámico
0	68.0	68.0	68.0	68.0	68.0	68.0
1	20.5	38.7	37.4	32.0	28.0	49.2
2	17.0	36.5	33.1	27.1	24.5	43.6
3	13.0	33.7	30.0	23.0	20.2	38.0

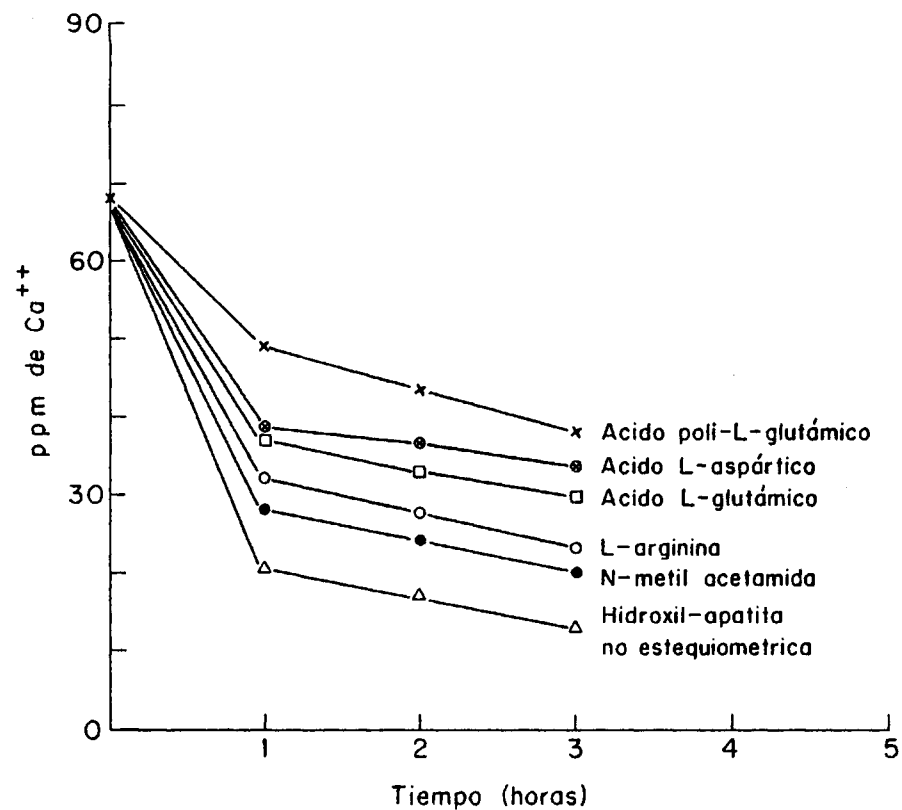


Fig. 56 .- Crecimiento cristalino de la hidroxil-apatita no estequiometrica en presencia de distintas moléculas orgánicas.

Tabla 12 .- Crecimiento cristalino de hidroxil-apatita y brushita en presencia de diferentes macromoléculas orgánicas.

t (horas)	Crecimiento de hidroxil-apatita			Crecimiento de brushita		
	Hidroxil- -apatita sola	Acido poli- -L-glutámico	Acido poliacrílico	Brushita sola	Acido poli- -L-glutámico	Acido poliacrílico
0	68.0	68.0	68.0	443.0	443.0	443.0
1	22.0	50.0	45.2	352.1	420.2	357.3
2	18.0	44.0	39.0	307.8	398.0	312.0
3	13.5	38.0	33.1	265.0	379.5	268.0

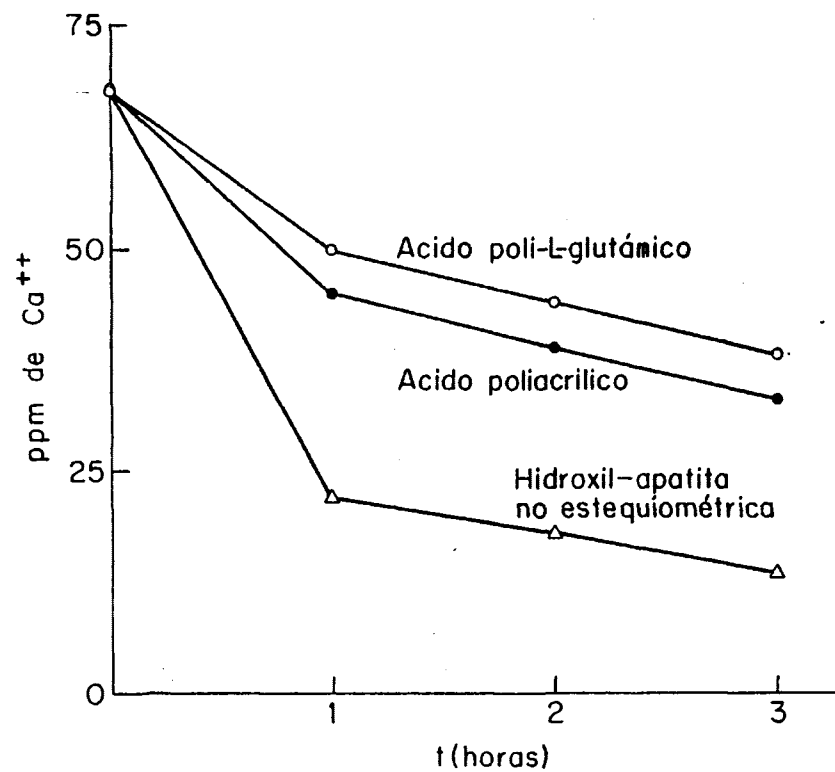


Fig. 57.- Crecimiento cristalino de la hidroxil-apatita no estequiométrica en presencia de distintas macromoléculas orgánicas.

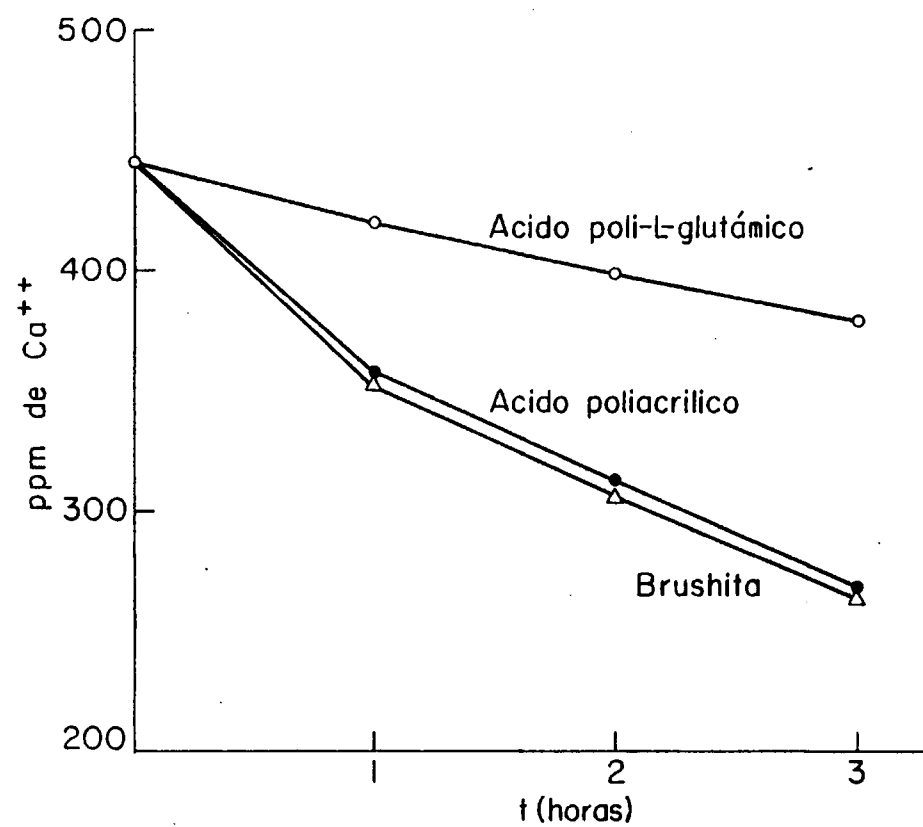


Fig. 58.- Crecimiento cristalino de la brushita en presencia de distintas macromoléculas orgánicas.

5.3.8.- Agregación de cristales de hidroxil-apatita no estequiométrica

En la tabla B se incluyen cinco columnas numéricas que representan los siguientes valores. La primera columna indica el diámetro de las partículas. La designada por la letra A representa el porcentaje de partículas que hay en la muestra con un diámetro mayor que el que aparece en la primera columna, antes de la incubación de microcristales de apatita. Los valores de las columnas B, C y D representan asimismo los porcentajes de partículas con diámetro superior al indicado en la primera columna, pero medidos dichos porcentajes después de dos horas de incubación a 25° C (columna B), y después del mismo tiempo de incubación en presencia de poli-L-aspártico (columna C) y poli-glicina (columna D), respectivamente.

Basándonos en estos valores se han construido los histogramas de las figuras 59 y 60 que representan los tantos por ciento de partículas de diámetros comprendidos entre cada dos valores determinados en el eje de abscisas. Calculando el porcentaje de cristales comprendidos entre 4 y 13 μ respecto al total se obtienen los valores de T, C y S que se presentan en la tabla 14.

Con estos resultados y mediante la fórmula indicada en la parte experimental, (sección 3.11. 8) se han obtenido unos coeficientes de agregación de 30.07 y 675.79 para las experiencias realizadas en presencia de ácido poli-L-aspártico y poli-glicina, respectivamente.

Tabla 13 .- Porcentajes de partículas de suspensiones cristalinas de hidroxil-apatita no estequiométrica.

	A	B	C	D
Diámetro de partícula (μ)	% acumulativo	% acumulativo	% acumulativo	% acumulativo
48.7	6.26	20.90	13.60	3.47
38.7	9.39	23.62	20.40	3.47
30.7	12.52	27.55	23.80	5.21
24.5	12.52	32.87	27.25	6.09
19.7	21.11	39.05	31.25	10.01
15.6	29.38	44.94	43.37	16.41
12.6	38.15	59.20	55.90	26.09
9.9	46.99	65.58	64.26	41.48
7.9	50.87	74.21	72.56	51.14
6.2	54.92	75.23	76.92	68.85
5.1	59.47	78.40	79.92	75.29
4.25	62.51	82.57	83.53	86.94
3.3	72.50	83.62	84.86	91.59
2.8	74.72	86.26	86.66	94.19

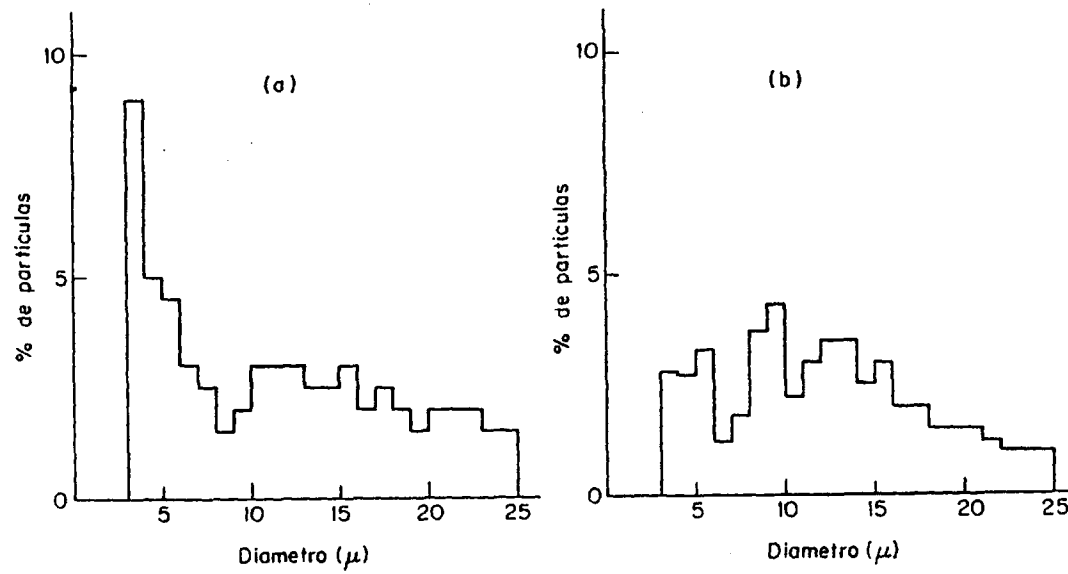


Fig. 59 .- Distribución de los diámetros de las partículas de hidroxil-apatita no estequiométrica:
a) en el momento de ser precipitada; b) después de 90 minutos de agitación a 37°C.

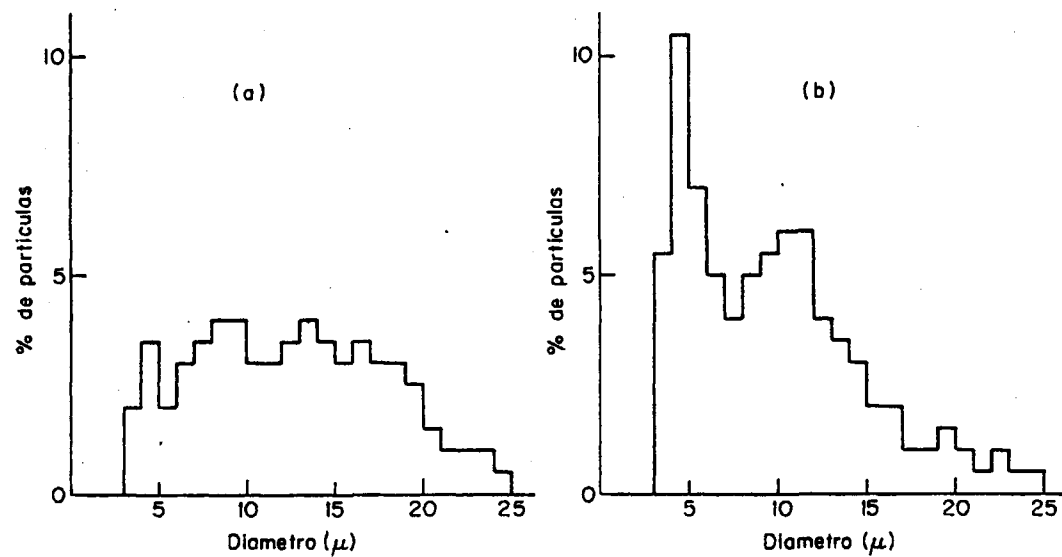


Fig. 60.- Distribución de los diámetros de las partículas de hidroxil-apatita no estequiométrica después de 90 minutos de agitación a 37°C: a) en presencia de ácido poli-L-aspartico; b) en presencia de poli-glicina.

Tabla 14.- Agregación de los cristales de hidroxil-apatita en presencia de distintos homopéptidos.

	Hidroxil-apatita sin incubación	Hidroxil-apatita con incubación	Hidroxil-apatita con incubación + poli-L-glicina	Hidroxil-apatita con incubación + poli-L-aspártico
Area integrada (5 - 25 μ)	1900	1788	2400	2140
Area integrada (5 - 13 μ)	900	920	1800	1040
Tanto por ciento	47.36 (T ₀)	51.45 (C)	75.00 (S ₁)	48.59 (S ₂)

		<u>Poli-L-glicina</u>	<u>Poli-L-aspártico</u>
coeficientes de agregación	$\left(\frac{S - T_0}{C - T_0} \times 100 \right)$	675.79	30.07

6.-DISCUSSION

6.1.- Mecanismo de la nucleación de la hidroxil-apatita no estequiométrica.

Un problema de interés, no sólo bajo el punto de vista de la litiasis renal, sino también de interés científico básico es determinar si la nucleación de las sustancias cristalinas depende de la estructura de las moléculas de otras sustancias presentes en la disolución o, más concretamente, si la nucleación depende de la relación entre la estructura de dichas moléculas y la red cristalina de la sustancia precipitada. Mc Cartney y Alexander (51) señalaron que los compuestos orgánicos que contienen grupos carboxilo retardan la precipitación de sulfato cálcico. En la precipitación de los fosfatos cálcicos pueden intervenir otros factores como el pH, fuerza iónica de la disolución, peso molecular de la sustancia orgánica presente, etc. (52) (53)(54). Para explicar el retardo de la precipitación de sustancias cristalinas en presencia de productos orgánicos, se ha recurrido, también, a un mecanismo de adsorción de aquéllos sobre núcleos cristalinos, inhibiendo así el posterior crecimiento de éstos y su precipitación (55).

Sin embargo, nuestros resultados experimentales sugieren que la estructura de las moléculas orgánicas presentes en la disolución, juega un papel significativo en la precipitación de hidroxil-apatita y brushita. En efecto, entre los resultados de este trabajo concernientes a la precipitación de hidroxil-apatita, figura una aceleración de la misma en presencia de ácido poli-L-glutámico ó poliacrílico (figura 14 , tabla 4), y una aceleración de la precipitación

de brushita en presencia de ácido poli-L-glutámico (figura 16 , tabla 5). Si el retardo de la precipitación espontánea por estos polímeros pudiera resultar de la adsorción de las especies moleculares sobre núcleos cristalinos, dicho mecanismo no es, sin embargo, adecuado para explicar la aceleración de las precipitaciones mencionadas. Esta consideración y el hecho de que un mismo polímero, como el ácido poliacrílico, sea prácticamente inactivo en la precipitación de brushita (figura 16) y, sin embargo, influya notablemente en la precipitación de la hidroxil-apatita, sugieren un mecanismo de nucleación heterogénea en el que se pongan en juego un acoplamiento del espaciado de los grupos carboxilato de estas macromoléculas a las distancias intercатиónicas de la sustancia precipitada, como se discute a continuación.

6.1.1.- Influencia de la estructura de las moléculas modelo

Los trabajos realizados sobre dicroísmo circular de los homopéptidos del ácido L-aspartico y L-glutámico indican que estos polímeros, en disolución acuosa y a pH superior a 5, poseen una estructura local helicoidal con aproximadamente tres monómeros por cada 360° de rotación alrededor del eje de la hélice (35) (56). Esta conformación separaría entre sí 120° a las cargas de los grupos carboxilato una vez proyectadas sobre un plano perpendicular al eje de la hélice. De esta manera, la energía libre electrostática se minimiza. Por la misma razón, se han propuesto estructuras análogas para el ácido poliacrílico (35) (57). Si en cada caso se supone que existen, pues, tres monómeros por cada giro de 360° alrededor de la

hélice, los grupos carboxilato mas próximos serán los que estén aproximadamente en la misma "generatriz" de aquélla. Con objeto de calcular el espaciado entre dichos grupos, hemos recurrido a unas expresiones matemáticas que permiten hallar los parámetros de la hélice en función de las longitudes de enlace, ángulos de enlace y ángulos de rotación interna de las macromoléculas estudiadas (33), como se indica en la sección 4.2.

6.1.1.1.- Relación entre las distancias interaniónicas de las macromoléculas y las distancias intercatiónicas de la celdilla unidad de la hidroxil-apatita.

A partir de los parámetros de red obtenidos para la hidroxil-apatita no estequiométrica utilizada en este trabajo ($a=b=9.41\text{Å}$; $c=6.82\text{Å}$) y por consideraciones de simetría de la celdilla unidad (58) hemos hallado las distancias intercatiónicas de ésta, supuesta estequiométrica, (figuras 61 y 62; tabla 15). Pero teniendo en cuenta que el grado de deficiencia, x , de las muestras utilizadas es alrededor de 1, las distancias incluidas en la tabla 15 existirán en una proporción del 90% dentro de las correspondientes a un cristal no estequiométrico.

Análogamente, a partir de los parámetros de la celdilla unidad de la brushita (59) (60) ($a=5.82\text{Å}$, $b=15.18\text{Å}$, $c=6.23\text{Å}$, $\beta=116^\circ 25'$) y teniendo en cuenta la simetría de la red cristalina, hemos determinado las distancias entre los diferentes átomos de calcio en la celdilla unidad de este producto, que se presentan asimis-

$a=b=9.432 \text{ \AA}$
 $c=6.881 \text{ \AA}$

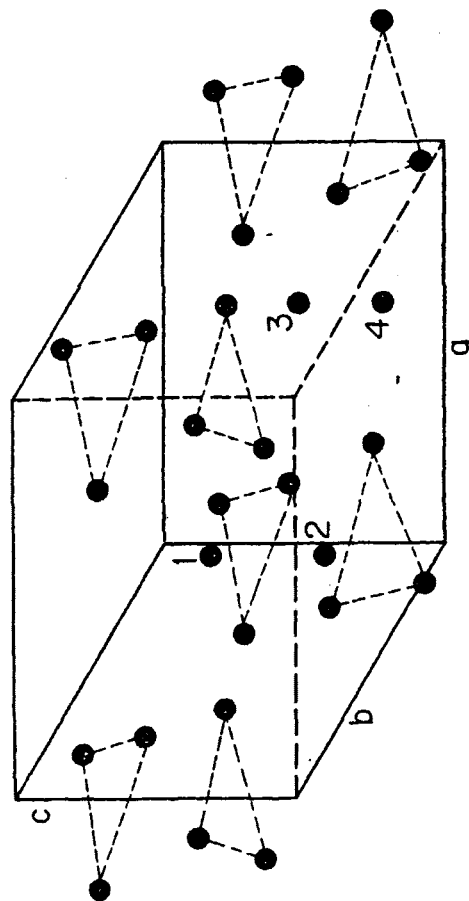


Figura 61.- Iones de calcio de la celdilla unidad de la hidroxil-apatita.

$a=b=9.432 \text{ \AA}$
 $c=6.881 \text{ \AA}$

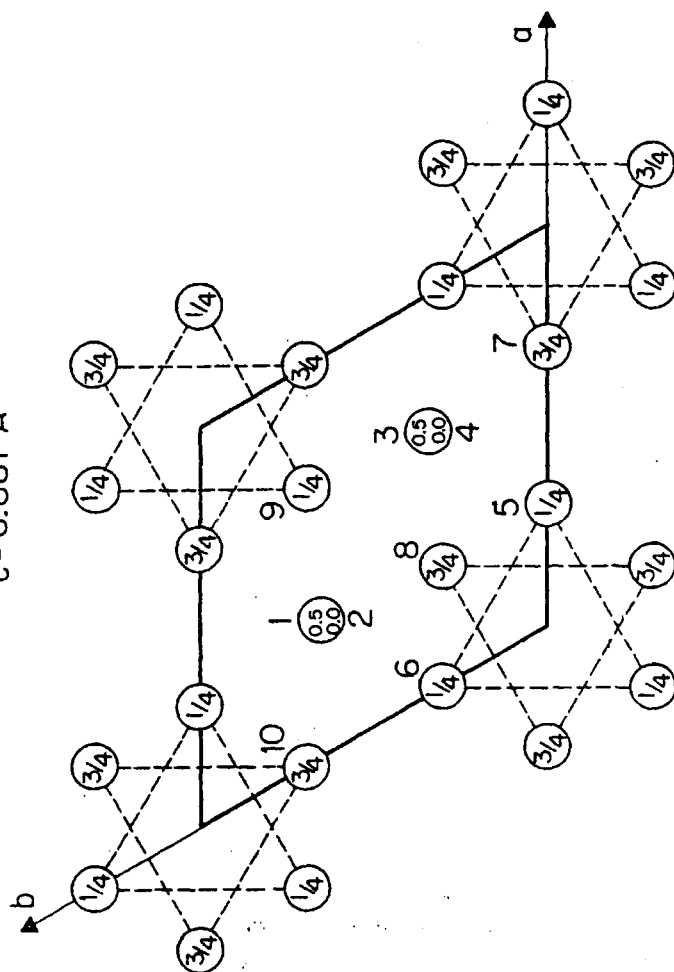


Figura 62 .- Iones de calcio de la celdilla unidad de la hidroxitil-apatita proyectada sobre el plano XY.

Tabla 15.- Distancias (Å) entre los iones de calcio de las celdillas unidad de la hidroxil-apatita y de la brushita.

<u>Hidroxil-apatita</u>				
Ca (1) - Ca (2) = 3.41	Ca (2) - Ca (3) = 6.44	Ca (3) - Ca (5) = 3.98	Ca (4) - Ca (8) = 3.98	Ca (6) - Ca (8) = 4.17
Ca (1) - Ca (3) = 5.43	Ca (2) - Ca (4) = 5.44	Ca (3) - Ca (6) = 6.17	Ca (4) - Ca (9) = 3.98	Ca (6) - Ca (9) = 6.21
Ca (1) - Ca (4) = 6.42	Ca (2) - Ca (5) = 6.17	Ca (3) - Ca (7) = 6.29	Ca (4) - Ca(10) = 9.08	Ca (6) - Ca(10) = 5.83
Ca (1) - Ca (5) = 6.07	Ca (2) - Ca (6) = 3.98	Ca (3) - Ca (8) = 6.29	Ca (5) - Ca (6) = 4.09	Ca (7) - Ca (8) = 6.23
Ca (1) - Ca (6) = 3.98	Ca (2) - Ca (7) = 9.08	Ca (3) - Ca (9) = 3.98	Ca (5) - Ca (7) = 5.83	Ca (7) - Ca (9) = 7.86
Ca (1) - Ca (7) = 10.30	Ca (2) - Ca (8) = 3.98	Ca (3) - Ca(10) = 10.30	Ca (5) - Ca (8) = 4.17	Ca (7) - Ca(10) = 12.22
Ca (1) - Ca (8) = 6.29	Ca (2) - Ca (9) = 3.98	Ca (4) - Ca (5) = 3.98	Ca (5) - Ca (9) = 6.21	Ca (8) - Ca (9) = 5.82
Ca (1) - Ca (9) = 3.98	Ca (2) - Ca(10) = 3.98	Ca (4) - Ca (6) = 6.17	Ca (5) - Ca(10) = 7.86	Ca (8) - Ca(10) = 5.70
Ca (1) - Ca(10) = 6.29	Ca (3) - Ca (4) = 3.41	Ca (4) - Ca (7) = 3.98	Ca (6) - Ca (7) = 9.16	Ca (9) - Ca(10) = 7.86

<u>Brushita</u>					
Ca (1) - Ca (2) = 8.59	Ca (1) - Ca (3) = 4.18	Ca (1) - Ca (4) = 8.59	Ca (2) - Ca (3) = 6.01	Ca (2) - Ca (4) = 5.58	Ca (3) - Ca (4) = 8.20

mo en la tabla 15 (figura 63).

Del examen de la figura 14 (tabla 4) se desprende que el ácido L-glutámico ejerce un ligero efecto en el retardo de la precipitación de hidroxil-apatita mientras que los ácidos poliacrílico y poli-L-glutámico influyen notablemente en este aspecto. Las partículas de sólido, una vez que sobrepasan un tamaño crítico, crecen rápidamente desprendiendo energía (61) y sería difícil aceptar que dichas partículas se dispersen después de alcanzar su tamaño crítico o que su crecimiento pueda ser detenido si la totalidad de los centros de crecimiento cristalino no fuesen cubiertos por las moléculas orgánicas añadidas.

Por consiguiente, el retardo de la precipitación debe ocurrir cuando las partículas son pequeñas. Movido por consideraciones similares, Naono (62) propuso un mecanismo de adsorción dinámico basado en la probabilidad de colisiones entre núcleos subcríticos de sulfato de estroncio e iones trifosfato que inhiben su posterior crecimiento y aumentan la dispersión de los núcleos.

La relación molar entre la hidroxil-apatita precipitable (con grado de deficiencia $x=1$) y el ácido L-glutámico presentes en la disolución que corresponde a la figura 14 , es alrededor de 0.38:1 y a priori, la inhibición parcial de la precipitación de hidroxil-apatita por el ácido L-glutámico, puede explicarse, bien por la dispersión de núcleos subcríticos o por la adsorción sobre núcleos próximos al tamaño crítico. Con respecto al ácido poli-L-glutámico, la situación

$$\begin{aligned} a &= 5.82 \text{ \AA} & b &= 15.18 \text{ \AA} \\ c &= 6.23 \text{ \AA} & \beta &= 116^\circ 25' \end{aligned}$$

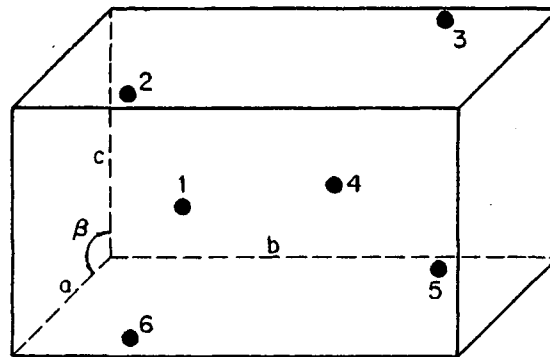


Figura 63.- Iones de calcio de la celdilla unidad de la brushita.

ción es bastante diferente. La relación molar entre la hidroxil-apatita precipitable con respecto al citado polímero es alrededor de 227:1. Si el mecanismo de retardo de la precipitación fuese debido a la dispersión de núcleos subcríticos, el ácido poli-L-glutámico hubiera sido menos efectivo que el monómero correspondiente. Pero lo contrario es lo que muestran nuestros resultados (figura 14, tabla 4). La relación 227:1 implica que los núcleos estabilizados por el ácido poli-L-glutámico, deben contener miles de iones.

Entonces, se pueden proponer dos hipótesis: (a) que los núcleos crezcan hasta el tamaño citado, antes de que el polímero se adsorba sobre ellos; (b) que las moléculas del polímero actúen como centros de nucleación. Al considerar la primera hipótesis pueden surgir varias dificultades. En principio, no parece haber razones convincentes por las cuales el polímero no se adsorba sobre los núcleos hasta que éstos crezcan a un tamaño de varios miles de iones y no antes. Además, un núcleo que contenga varios miles de iones puede poseer muchos centros de crecimiento y parece muy improbable que la fortuita flexibilidad de estos polímeros permita bloquear a todos aquéllos.

Una explicación alternativa a esta teoría, puede consistir en la formación inicial de unas especies salinas resultantes de la unión de moléculas de polímero e iones calcio. Estas especies (Polímero—Ca⁺⁺) estarían cargadas positivamente y atraerían a iones fosfato de la solución sobresaturada.

La distancia media entre los grupos carboxilato del ácido

poli-L-glutámico es 6.00 - 7.54 Å (tabla 2), que es próxima a algunas distancias intercatiónicas de la celdilla unidad de la hidroxil-apatita precipitada. Por ejemplo, Ca(1) - Ca(4), Ca(2) - Ca(3), incluso la distancia definida por el eje c (6.82 Å), etc. De esta manera, se producirán fragmentos de materia cristalina que tienen las dimensiones internas de los cristales de hidroxil-apatita. La deposición de iones adicionales se reduce a un problema de crecimiento de esos microcristales.

En el caso de la brushita (figura 16 , tabla 5), el ácido poli-L-glutámico acelera notablemente la precipitación, mientras que el ácido poliacrílico influye muy ligeramente en la misma. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que las distancias intercatiónicas de la brushita (tabla 15) son considerablemente mayores que las interaniónicas del ácido poliacrílico (tabla 2) lo cual dificulta un acoplamiento entre ambas. No sucede lo mismo con el ácido poli-L-glutámico cuyo espaciado intercarboxilo (tabla 15) se puede ajustar a las distancias Ca (2) - Ca (3) de la celdilla unidad de la brushita e incluso a las distancias intercatiónicas definidas por el eje c (figura 63).

6.1.1.2.- Número de partículas y su relación con el mecanismo de nucleación heterogénea de la hidroxil-apatita.

Otra prueba del mecanismo de nucleación heterogénea de la precipitación de la hidroxil-apatita en presencia de ácido poli-L-glutámico, estriba en la determinación del número de partículas en la disolución y su dependencia con la concentración de polímero

añadido.

Si se realizan dos precipitaciones de hidroxil-apatita en presencia de ácido poli-L-glutámico, de forma que las concentraciones del mismo varíen de un caso a otro según la relación 2:1 y las concentraciones de calcio y fósforo sean iguales en ambas experiencias, es evidente que en el caso en que el polímero esté más concentrado habrá tendencia a formarse partículas más pequeñas debido a la existencia de más centros de nucleación. Por consiguiente, en tal caso, las partículas más pequeñas serán más abundantes.

Si en la tabla 6 se consideran las partículas más pequeñas, entre 4.6 y 7.0 micras, por ejemplo, medidas a concentración $10.6 \cdot 10^{-4} N$ de ácido poli-L-glutámico, el porcentaje de las mismas es alrededor del 5%. Sin embargo, en la precipitación de la misma hidroxil-apatita en presencia del mismo polímero a concentración $5.3 \cdot 10^{-4} N$, ese porcentaje es, aproximadamente, la mitad. Es decir, se obtiene una relación aproximadamente igual a la de las concentraciones de microsustratos presentes en la disolución en ambos casos. Esto apoya el mecanismo de nucleación heterogénea de la hidroxil-apatita en presencia de ácido poli-L-glutámico.

6.1.1.3.- Influencia de la concentración de las moléculas modelo con respecto a las de calcio y fósforo.

El depósito de iones adicionales sobre los núcleos cristalinos formados en cada sustrato molecular se reduce a un problema de crecimiento de esos microcristales. Pero el crecimiento de éstos

puede venir limitado por la cantidad de electrolito precipitable que exista en la disolución, el cual, como ocurre en la experiencia de la figura 15, se agota una vez que sobre cada molécula de ácido poli-L-glutámico se depositen alrededor de 227 grupos iónicos equivalentes a la fórmula de la hidroxil-apatita con grado de deficiencia $x=1$ (Sección 3.8). En realidad, el crecimiento cesará antes, puesto que siempre quedarán iones en disolución en equilibrio con la fase sólida. Para la experiencia correspondiente a la figura 15, el número de microcristales formados por litro de disolución es $54.5 \cdot 10^{11}$ y el peso de cada uno de ellos $0.37 \cdot 10^{-18}$ g. Se trata, pues, de cristales muy pequeños que dan sólo una turbidez muy débil, o sea, unos valores de transmisión que se acercan al 100% (figura 15, tabla 4). En algunos trabajos de la literatura (63) se ha indicado que una disolución sobresaturada de clorato sódico no comienza a cristalizar hasta que el peso de las partículas de soluto añadidas excede de los 10^{-9} g. La adición de $54.5 \cdot 10^{16}$ microsustratos de precipitación origina, pues, microcristales muy pequeños que posteriormente no pueden crecer por agotamiento del electrolito precipitable. Por ello, en las condiciones experimentales que corresponden a la figura 14 se obtiene un aparente retardo de la precipitación. En cambio, en experiencias realizadas a la misma concentración de microsustratos, pero con mayor cantidad de calcio y fosfato (figura 15), los núcleos cristalinos formados inicialmente crecerán más que en el caso de la figura 14 y a la velocidad impuesta por la nucleación heterogénea, con lo que se obtiene una precipitación acelerada con respecto a la precipitación de hidroxil-apatita pura. Análogamente ocurre con el ácido poliacrílico en la precipitación apatítica.

6.2.- Crecimiento de cristales de hidroxil-apatita no estequiométrica

En principio, el crecimiento de cristales de hidroxil-apatita puede tener lugar con mayor ó menor preponderancia de uno de los siguientes mecanismos:

a) Interacción de las moléculas modelo con los iones Ca^{++} de la disolución, alterando la actividad de estos iones.

b) Adsorción de las moléculas modelo sobre la superficie cristalina, bien sobre la mayor parte de ésta, sobre determinadas caras, sobre ciertos puntos situados en distorsiones reticulares, etc.

La mayor parte de las sustancias orgánicas que hemos estudiado forman complejos débiles con los iones de calcio (64) (65), pero ello no constituye condición suficiente para producir una marcada influencia en el crecimiento de los cristales de este fosfato. En efecto, en las condiciones de este trabajo, elegidos para el crecimiento de cristales de hidroxil-apatita, la concentración de ión calcio con respecto a los aminoácidos añadidos es aproximadamente de 6 átomos-gramo de calcio para cada mol de aminoácido, y de 3.500 átomos-gramo de calcio por cada mol de polímero en el caso del ácido poli-L-glutámico. Así, las concentraciones de las sustancias modelo son pequeñas con respecto a las del calcio de la disolución y, por lo tanto, el de crecimiento de la concentración de iones calcio libres por formación de complejos será relativamente pequeño. Además para los tres aminoácidos estudiados puede deducirse, a partir de sus constantes de estabilidad (64), que la cantidad de calcio unido a ellos es del orden de la décima parte del calcio inicial en los tres casos. La similitud de

estos valores, no es, sin embargo, coherente con las diferencias habida entre la influencia de cada uno de estos aminoácidos sobre el crecimiento de cristales de hidroxil-apatita. (tabla 4). A este respecto, definimos la expresión:

$$(1 - (P_o - P_x) (P_o - P_{HA})) \times 100 \quad (25)$$

para estimar la disminución relativa del crecimiento de cristales de hidroxil-apatita cuando se añade a la suspensión cristalina cada una de las sustancias orgánicas estudiadas. P_o son las partes por millón de calcio de la solución inicial; P_x y P_{HA} son las partes por millón de calcio que permanecen en disolución después de una incubación de 1 hora, en presencia ó no de sustancia orgánica, respectivamente. Sobre esta base, se puede hallar que mientras con el ácido L-aspártico se obtiene una disminución del 40%, con la L-arginina se obtiene un 25%.

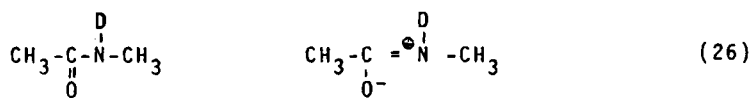
Estas diferencias se pueden explicar teniendo en cuenta que el crecimiento de cristales de hidroxil-apatita tiene lugar mediante un proceso de adsorción que implica diferentes tipos de interacción apatita-adsorbato, unas determinadas conformaciones de las especies adsorbidas en la superficie, influencias debidas a los pesos moleculares de éstas, acoplamiento de las distancias interaniónicas del adsorbato a las distancias intercatiónicas de la celdilla unidad del adsorbente, etc. Estos factores se discuten a continuación sobre la base de los resultados obtenidos.

6.2.1.- Naturaleza de la interacción de las moléculas modelo estudiadas con la hidroxil-apatita no estequiometrica y su conformación en la superficie apatítica.

6.2.1.1.- N-metil acetamida

Las interacciones específicas entre el grupo peptídico y la hidroxil-apatita se pueden detectar mediante la espectroscopía de vibración, usando los métodos seguidos en los estudios del enlace de hidrógeno. Con este fin, las asignaciones que hemos realizado para la N-metil acetamida se han basado, por analogía, en las de la literatura para esta sustancia, en líquido y en disolución diluida en disolventes apolares (36)(66-70).

De acuerdo con la literatura citada, la molécula de N-metil acetamida está estabilizada por resonancia entre las dos estructuras siguientes:



La contribución de la estructura polar con carga negativa en el átomo de oxígeno explica el fuerte poder aceptor del grupo peptídico.

La resonancia entre las dos estructuras citadas anteriormente, viene afectada por la formación de enlaces de hidrógeno y por la

adsorción de la molécula sobre la superficie apatítica como se indica en la tabla 7 (figuras 17, 18 y 19). Estos cambios se pueden explicar mediante la naturaleza de las vibraciones de la N-metil acetamida, como sigue. La banda amida I surge fundamentalmente de la vibración de valencia del grupo carbonilo, y la amida II de la vibración de deformación en el plano del enlace N-D. Por consiguiente, la disminución de la frecuencia de la banda amida I indica una pérdida del carácter de doble enlace en el grupo carbonilo, y el aumento de la frecuencia de la banda amida II se puede explicar si se considera que el enlace N-D se fija a través del átomo de deuterio como sucede, por ejemplo, en el caso de la formación de enlace de hidrógeno. A este respecto, los cálculos para el sistema triatómico lineal A-H... A indican un aumento de la frecuencia de deformación en el plano, $\delta(A-H)$, cuando disminuye la frecuencia $\nu(A-H)$ (71). Parte de la energía potencial del modo correspondiente a la banda amida II proviene de la vibración de valencia C - N (67) (68). Por consiguiente, el aumento de la frecuencia amida II se deberá también a un incremento del carácter de doble enlace en el grupo C - N.

Por lo tanto, las variaciones de frecuencias mostradas en la tabla 7 al pasar de la N-metil acetamida en disolución a la misma sustancia líquida ó adsorbida sobre la apatita, sugiere que la contribución de la estructura polar resonante indicada anteriormente es mayor en la N-metil acetamida líquida ó adsorbida sobre la apatita que en disolución diluida en tetracloruro de carbono.

Estas consideraciones y las características espectrales de la N-metil acetamida adsorbida sobre la hidroxil-apatita (figuras 17 y 18) son coherentes con la hipótesis de que las moléculas de adsorbato se unen a los cationes superficiales sólo por mediación de la carga negativa del oxígeno que aparece en la estructura polar resonante citada anteriormente. En efecto, si se compara la banda amida I para esta sustancia en disolución y adsorbida sobre la superficie apatítica (tabla 7), su frecuencia de vibración es menor en el segundo caso como consecuencia de una mayor contribución de la estructura canónica polar. Por otra parte, la frecuencia de la banda amida I da una correlación lineal con q/r (carga/radio) para los iones alcalino-térreos que forman parte de la correspondiente hidroxil-apatita (figura 64), lo cual sugiere que la mayoría de los centros de adsorción apatíticos reside en los cationes superficiales. Sobre esta base, parece lógico suponer que la molécula de N-metil acetamida se una a la superficie apatítica a través del oxígeno carbonílico. A conclusiones análogas se ha llegado en el estudio de la interacción de amidas secundarias en disoluciones de sales alcalinas y alcalino-térreos (72-82).

Del espectro infrarrojo de esta sustancia adsorbida (figuras 17 y 18) parece deducirse además que el grupo N-D permanece libre cuando la proporción amida/apatita es pequeña. Así pues, las bandas $\nu(N-D)$, amida I y amida II sufren un incremento en su anchura y un desplazamiento en sus frecuencias, típicos de una asociación intera

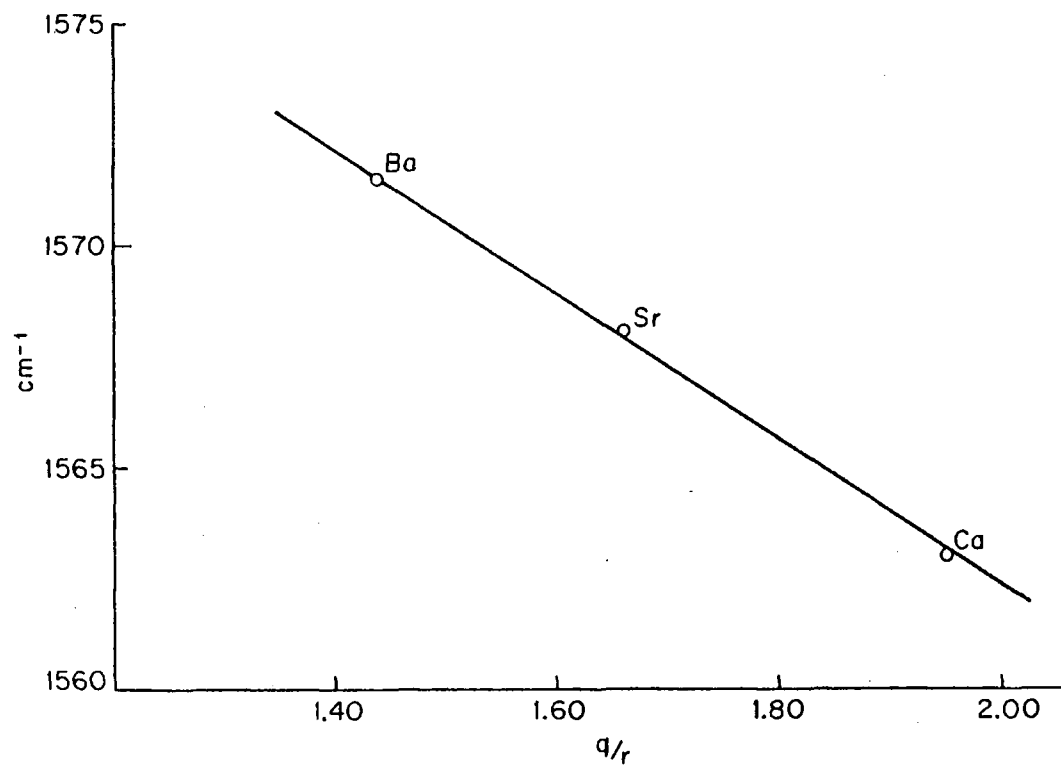


Figura 64 .- Frecuencia de la banda amida I de la N-metil acetamida N-deuterada con respecto a la relación carga/radio (u.e.e./Å) de cationes apatíticos.

mida conforme aumenta la cantidad de adsorbato sobre la superficie apatítica. Estos resultados pueden interpretarse teniendo en cuenta que cuando la cantidad de sustancia adsorbida es pequeña no existe interacción amida-amida. Los grupos N-D permanecen, entonces, libres y dan lugar a una anchura de banda $\nu(\text{N-D})$ más pequeña que cuando la cantidad de adsorbato aumenta y exista una interacción molecular como consecuencia de la depositación de una segunda monocapa ó de la disminución de las distancias intermoleculares dentro de la primera capa adsorbida.

La posición de la banda a 2569 cm^{-1} en la apatita cálcica, (ta**bla** 7) ($\nu(\text{N-D})$), según el modelo de adsorción propuesto no interacciona con la apatita, está próxima a la frecuencia de la misma vibración de la N-metil acetamida en conformación trans en disolución diluida en CCl_4 (2578 cm^{-1} , tabla 7). Admitiendo que las moléculas de adsorbato adopten dicha conformación en la superficie, es de esperar que la frecuencia $\nu(\text{N-D})$ sea menor que en disolución diluida, ya que debido a una mayor contribución de la estructura resonante polar, la constante de fuerza de la vibración $\nu(\text{N-D})$ debe disminuir en el prímer caso. En cambio, si se supone que las moléculas adoptan en la superficie la conformación cis, por el mismo razonamiento anterior, la frecuencia $\nu(\text{N-D})$ debería ser inferior que cuando dicho confórmero está en disolución diluida en CCl_4 , es decir, menor que 2540 cm^{-1} (tabla 7) y esto no ocurre en nuestro caso.

Todos estos hechos apuntan, pues, a la posibilidad de que las moléculas de N-metil acetamida adoptan en la superficie apatítica la conformación trans (como en la sustancia líquida) uniéndose a los átomos de calcio superficiales a través del oxígeno del grupo carbonilo.

Finalmente, el efecto del enlace de la N-metil acetamida sobre la superficie apatítica se pone de manifiesto comparando las frecuencias amida I de las moléculas adsorbidas con las de la misma sustancia en disolución diluida (tabla 7).

Estos valores, cuando se comparan a su vez con las correspondientes frecuencias de la N-metil acetamida líquida, indican que las interacciones amida-apatita son ligeramente mayores que las interacciones amida-amida. En este último caso, dicha interacción resulta ser del orden de 8 kcal/mol (83). La interacción amida-apatita, por otra parte, es mas débil que la que corresponde a la adsorción de los ácidos L-glutámico y L-aspartico, (Sección 6.2.1.2.) pues se consigue desorber con mucho menos disolvente la N-metil acetamida que los aminoácidos citados. Además, la sustitución iónica superficial que, como veremos a continuación existe en la adsorción de los mencionados aminoácidos sobre la hidroxil-apatita, implica una interacción aminoácido-apatita más fuerte que la de amida-apatita. Esto explica que la N-metil acetamida sea menos eficaz en la reducción del crecimiento cristalino del adsorbente que en los casos de adición de ácido L-aspartico ó L-glutámico (tabla 11). Estas diferencias no pueden explicarse, de otro lado, por consideraciones conformacionales de las molé

culas de adsorbato en la superficie del adsorbente. Así, teniendo en cuenta que el grupo carbonilo de las moléculas de N-metil acetamida adopta una orientación prácticamente perpendicular a la superficie apatítica y que aquéllas poseen una conformación trans, como parece deducirse de los resultados espectroscópicos, cada molécula de N-metil acetamida proyectará sobre la superficie del adsorbente un círculo de 2.35 \AA de radio (84). Como se discutirá en el apartado siguiente esto significaría que cuando la fracción de superficie cubierta sea 1, la N-metil acetamida dispondrá del mismo porcentaje de centros de adsorción (átomos de calcio superficiales) que los ácidos L-aspartico y L-glutámico. La menor eficacia de la N-metil acetamida en la reducción del crecimiento de cristales de hidroxil-apatita reside, pues, en que su interacción con el adsorbente es más débil que la de éste con las otras sustancias orgánicas adsorbidas.

6.2.1.2.- Acidos L-aspartico y L-glutámico

La concordancia entre el modelo de adsorción de Langmuir (ecuación 23) y los resultados experimentales, se hace patente considerando la linealidad de las gráficas correspondientes a las figuras 24 y 26. Este modelo de adsorción constituye una base válida para dilucidar el mecanismo según el cual tiene lugar la adsorción de estas sustancias sobre la superficie apatítica. Como se sabe, la isoterma de Langmuir se cumple para un conjunto de moléculas rígidas y no es válida cuando las moléculas cambian de conformación y ocupan áreas variables sobre la superficie a medida que varía la concentración de la disolución. De especial importancia es el hecho de que los

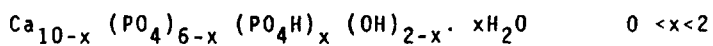
parámetros de afinidad, K , para la adsorción de estos dos aminoácidos son muy similares, (tabla 8), lo que se puede interpretar admitiendo que en el proceso de adsorción intervienen grupos funcionales similares de estos dos aminoácidos, fijándose en determinados sitios de la superficie apatítica.

De la comparación de los espectros infrarrojos de estas sustancias en disolución de agua pesada y adsorbidas sobre la superficie apatítica (figuras 21a, 21b, 22a y 22b) se advierte un desplazamiento de la banda simétrica "stretching" $\nu(\text{COO}^-)$ ($\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$) hacia frecuencias más altas ($\sim 1415 \text{ cm}^{-1}$). Frecuencias y desplazamientos muy similares hemos observado para este tipo de vibración en el espectro infrarrojo del poli-L-glutamato sódico en D_2O y en el de la sal cálcica del ácido poli-L-glutámico (figuras 41 y 42). Estos resultados parecen indicar que la interacción de las moléculas adsorbidas sobre la apatita tiene lugar al menos a través de los grupos carboxilato.

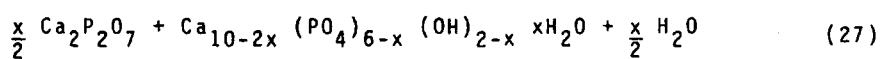
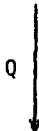
Teniendo en cuenta que las moléculas de adsorbato poseen una carga negativa neta en las condiciones experimentales utilizadas (85) parece lógico suponer que estas moléculas se unan a los iones calcio de la superficie apatítica ó, lo que es lo mismo, las moléculas de adsorbato sustituirán a aniones de la hidroxil-apatita, como se indica

a continuación.

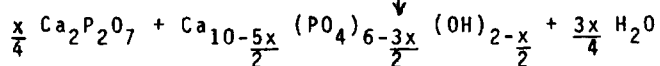
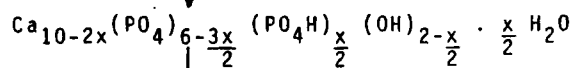
Cuando la hidroxil-apatita no estequiométrica se calienta a una temperatura ligeramente inferior a 700° C, tienen lugar las siguientes reacciones (86)



(hidroxil-apatita no estequiométrica)

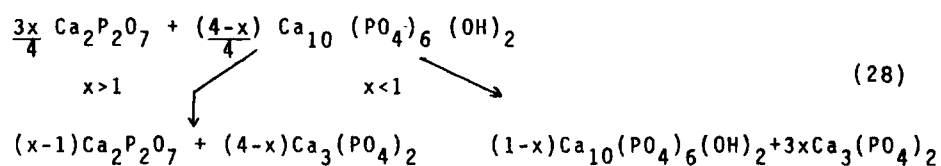


mecanismo
prototrópico



(hidroxil-apatita estequiométrica)

Si, posteriormente, la temperatura sobrepasa los 700° C, tendrá lugar, según los mismos autores (86), las siguientes reacciones dependiendo del grado de deficiencia de la hidroxil-apatita inicial



De acuerdo con este esquema, si los aniones aspartato ó glutamato sustituyen a grupos de hidroxilo y/o fosfato de la apatita inicial, no se alcanzarán las proporciones iónicas adecuadas para la formación de hidroxil-apatita estequiométrica, más estable que la deficiente, lo que implica la formación de una cantidad de pirofosfato cálcico inferior a la que se obtendría en el caso en que estas sustituciones iónicas superficiales no tuvieran lugar. En efecto, en los espectros infrarrojos de las figuras 27 y 28 se pone de manifiesto que cuando la apatita contiene aminoácido adsorbido, la absorbancia de la banda a 715 cm⁻¹ del pirofosfato formado al calentar la muestra, disminuye ostensiblemente.

La sustitución de aniones apatíticos por aniones de adsorbato, viene confirmada por los resultados obtenidos en las determinaciones de la relación Ca/P en apatita pura y apatita conteniendo aminoácido adsorbido (Sección 5.3.2.3.). Se observa un aumento de

la citada relación en el segundo caso, indicativo de una sustitución de iones fosfato por aniones aspartato.

Otros resultados experimentales pueden explicarse según el modelo de adsorción propuesto. El modelo usado en este trabajo pre supone la presencia de centros de adsorción discretos sobre la superficie de la hidroxil-apatita. Consideramos que estos centros corres ponden a los iones calcio (I), correspondientes a los átomos 1,2,3 y 4 de las figuras 61 y 62, situados en las caras (1 0 0) de los cris tales de hidroxil-apatita. Esta suposición viene justificada por la morfología de los cristales del adsorbente, correspondiendo a prismas hexagonales. Así, la mayor parte del área superficial expuesta al proceso de adsorción corresponderá a caras (1 0 0), que incluyen iones Ca (I) dispuestos en columnas paralelas al eje c y separados entre sí 3,41 Å, de acuerdo con nuestros resultados experimentales de deter minación de los parámetros de la celdilla unidad. La distancia entre las distintas columnas de Ca (I) en las mencionadas caras correspon de a la longitud del parámetro a de la celdilla unidad, es decir 9,41 Å. Esta distancia intercatiónica define la geometría de la hi-droxil-apatita en el proceso de adsorción, si bien hay que considerar la existencia de algunos huecos debidos a la no estequiometría de la apatita utilizada. Pero como el grado de deficiencia de la misma es aproximadamente 1, alrededor del 90% de las distancias intercatiónicas vendrán decididas por los parámetros anteriormente citados. En lo que concierne a la geometría de las moléculas de adsorbato, Einspahr y

Bugg (87) han determinado las distancias interatómicas y los ángulos de enlace para el glutamato cálcico, así como la conformación del anión. Para el anión aspartato hemos considerado longitudes y ángulos de enlace iguales a los homólogos del glutamato cálcico, y sobre esta base hemos determinado su conformación mas estable mediante el uso de métodos de cálculo semi-empíricos (CNDO/2) (Sección 4.1.).

A partir de estas consideraciones se pueden determinar las longitudes moleculares máximas de estos aminoácidos, a saber 5.43 y 3.93 Å para el ácido L-glutámico y L-aspartico respectivamente. Un modelo basado en la hipótesis de que el eje mayor de estas moléculas esté dispuesto paralelamente a la superficie apatítica no explicaría satisfactoriamente los datos de absorción. En efecto, admitiendo que las moléculas de aminoácido adoptan una determinada inclinación respecto a la superficie cristalina, que están fijas en la superficie apatítica a traves del grupo carboxilo terminal, y que tienen libertad de rotación, el volumen de absorción vendría determinado por un cono en cuyo vértice habría un grupo carboxilato unido a un átomo de calcio de la superficie apatítica. Entonces, cualquier otro ión de calcio situado dentro de la proyección del cono sobre la superficie, no actuaría como un sitio ó centro de adsorción.

Si consideramos que las moléculas de adsorbato se disponen paralelas a la superficie del adsorbente, las proyecciones sobre ésta, serían círculos de radios 5.43 y 3.93 Å para los iones glutamato y aspartato, respectivamente. Esto significa que el primero se fi

jaría sobre una cuarta parte de los átomos de calcio y sobre una tercera parte el segundo. Pero estos datos no están de acuerdo con la relación entre los números máximos de centros de adsorción entre el aspártico y el glutámico, que tiene un valor de 1.14 (ver tabla 8)

Una disposición aproximadamente vertical de estas especies adsorbidas darían unos radios de proyección de 1.75 Å para el aspártico, 1.77 Å para el glutámico lo cual, por consideraciones geométricas, daría un valor igual a la unidad para la relación citada. La diferencia con respecto a 1.14 puede explicarse teniendo en cuenta que, en realidad, la superficie cristalina presenta generalmente irregularidades y distorsiones en su estructura. Además, cuando se pasa del ácido aspártico al ácido glutámico, la rama lateral aumenta en un grupo $-CH_2-$ y es razonable considerar que la flexibilidad de la molécula adsorbida crezca a medida que crece la longitud de la cadena mencionada. Por consiguiente, se ha de suponer que el ángulo formado entre la molécula de aspártico y la superficie apatítica es mayor que para el ácido glutámico. La hipótesis de que en la adsorción de estas moléculas interviene solo el grupo carboxilo terminal, viene apoyada por el hecho de que las afinidades (parámetro K , ver tabla 8) son muy parecidas en estos dos aminoácidos, indicando que no existe ningún incremento medible de la energía de adsorción, cuando un grupo $-CH_2-$ se añade a la molécula de adsorbato. Este resultado es bastante diferente al obtenido, por ejemplo, en la adsorción sobre carbón de una serie de ácidos comprendidos entre el fórmico y el butírico (88).

Por otra parte, las distancias interaniónicas (5.43 y 3.90 Å) son diferentes de las intercatiónicas dentro de las caras (1 0 0) (Sección 6.1) de la apatita, lo que no favorece una disposición horizontal de las moléculas de adsorbato sobre la superficie apatítica. Además, en el carbono C_α existen dos grupos con carga opuesta ($-NH_3^+$ y $-COO^-$) que se oponen recíprocamente a que uno de ellos se fije en la superficie sobre un ión de carga opuesta. Todas estas observaciones son consistentes con la hipótesis de que en la adsorción de estas moléculas sobre la hidroxil-apatita intervenga sólo el grupo carboxilo terminal.

Las superficies específicas calculadas a partir de los parámetros N son bajas cuando se comparan con las determinadas por el método B.E.T. Así pues, para el ácido aspártico, el número máximo de moléculas por gramo de apatita vendría dado por $21.6 \cdot 10^{-6}$ moles/gramo $\cdot 6,022 \cdot 10^{23}$ moléculas/mol = $1.30 \cdot 10^{19}$ moléculas/gramo. Como un anión de este aminoácido de acuerdo con la orientación que adopta en la superficie, ocupa un círculo de proyección que incluye dos átomos de calcio, la superficie efectiva que comprende sólomente un centro de adsorción, será la de una cara (1 0 0) de la celdilla unidad, es decir 64.18 Å^2 .

Por lo tanto, la superficie máxima cubierta por los aniones aspartato sería la equivalente a $8.43 \text{ m}^2/\text{g}$, que es menor que la de $70.0 \text{ m}^2/\text{g}$, determinado por el método B.E.T. Hay al menos dos factores que pueden contribuir a esta discrepancia. En primer lugar, el acceso de las moléculas de adsorbato a la superficie del adsorbente

(intersticios y defectos) es diferente para el nitrógeno que para las moléculas estudiadas en este trabajo. En segundo lugar, aunque se ha partido de la hipótesis de que la mayor parte de la superficie adsorbente corresponde a las caras (1 0 0), en realidad, puede no ser rigurosamente cierto puesto que, en general, las superficies cristalinas presentan irregularidades, distorsiones, que pueden contribuir a una adsorción más baja que la predicha por la adsorción de nitrógeno. Además, en las caras (1 0 0) hay vacantes catiónicas como consecuencia de que la hidroxil-apatita considerada en este trabajo no es estequiométrica.

Digamos para concluir que la proximidad de los valores encontrados para los parámetros de afinidad, K , en la adsorción de estos dos aminoácidos sobre la hidroxil-apatita (tabla 8) y, de otro lado, la similitud de la conformación de las moléculas respectivas sobre la superficie del adsorbente, son coherentes con la proximidad de los valores obtenidos en la disminución del crecimiento de cristales apatíticos en presencia de cada uno de estos dos aminoácidos (tabla 11).

6.2.1.3.- L-arginina

Cuando la hidroxil-apatita que contiene L-arginina adsorbida se calcina, se obtiene un espectro infrarrojo (figura 34) en el que no se hace visible la banda del ión pirofosfato hacia 715 cm^{-1} . Como se ha indicado en la sección 6.2.1.2., esto supone la sustitución de iones superficiales de la hidroxil-apatita por iones de

L-arginina. Es difícil admitir que exista una sustitución de aniones superficiales por las cargas negativas de los grupos carboxilato de este aminoácido, pues esto supondría la formación de una capa adsorbida electropositiva que daría lugar a un aumento de energía libre. Por consiguiente, se puede admitir que existe una sustitución de iones calcio por los iones de L-arginina portadores de una carga positiva neta. Esta hipótesis es coherente con los resultados cromatográficos obtenidos por Bernardi y colaboradores (89), quienes observaron que este aminoácido se adsorbe sobre la hidroxil-apatita en mayor proporción en presencia de tampón de fosfato a pH 7.8 que a pH 6.8. Posteriormente, otros autores (10) han atribuido esta diferencia a que a pH 7.8 una fracción importante ($\sim 80\%$) de los iones fosfato superficiales existen como PO_4H^- , mientras que a pH 6.8 existen en la forma PO_4H_2^- . Así, el pH de 7.8 originaba un enriquecimiento de iones de valencia más alta, o sea, centros de adsorción de mayor afinidad para los grupos positivos del adsorbato. Esto es coherente con nuestros resultados de la relación Ca/P en hidroxil-apatita conteniendo L-arginina adsorbida (Sección 5.3.3.3.).

Sobre esta base, cabe una explicación para la menor adsorción de L-arginina sobre la hidroxil-apatita que la de los aminoácidos ácidos sobre ésta a la misma concentración inicial (tablas 8 y 9). Para ello, habrá que comparar la interacción electrostática de los iones calcio con los carboxilato (adsorción de los aminoácidos ácidos) y la de los iones PO_4H^- con los grupos positivos de la L-arginina (adsorción de L-arginina). En ambos casos, se trata de interacción de cargas que están en la relación de 2:1 para los centros de

adsorción y del adsorbato respectivamente. Pero en la interacción $\text{-COO}^- \dots \text{Ca}^{++}$, la carga del centro de adsorción cálcico está más localizada que en el caso de que dicho centro sea un anión PO_4H^- . Además, en lo que respecta a la carga de los grupos del adsorbato, ésta se deslocaliza más en el grupo guanidinio que en los aniones carboxilato. La conformación de las moléculas en la superficie influirá también en las diferencias habidas entre la adsorción de la L-arginina y de los aminoácidos ácidos sobre la hidroxil-apatita. Así, las moléculas de L-arginina serán más flexibles que las de los ácidos L-aspartico y L-glutámico como consecuencia de la mayor longitud de sus cadenas. Esa mayor flexibilidad permitirá que las moléculas de este aminoácido básico se fijen a la superficie por mediación de otros grupos además del guanidinio. La orientación estadística de estas moléculas en la superficie, como parece indicar el pequeño aumento de la superficie específica (Sección 5.3.3.2.), dá lugar a que la isoterma de adsorción correspondiente no se ajuste a la ecuación de Langmuir (figura 33).

6.2.1.4.- Poli-glicina

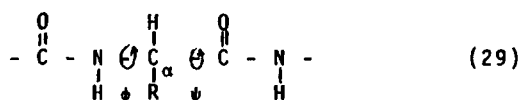
La banda amida I de esta sustancia adsorbida sobre la hidroxil-apatita aparece hacia 1610 cm^{-1} (figura 35) lo que induciría a considerar que se trata de una estructura β correspondiente a la poli-glicina I) (42). Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados de adsorción de la N-metil acetamida y los espectros de mezclas de sales con este polímero, en estado sólido (42), la interacción de los iones alcalinos y alcalinoterreos con el grupo peptídico, desplazan las frecuencias amida I a valores más bajos. Par

consiguiente, no se puede atribuir a la poli-glicina adsorbida sobre la hidroxil-apatita, una determinada estructura sin ayuda de otras bandas del espectro infrarrojo y del correspondiente espectro Raman.

6.2.1.5.- Acidos poli-L-aspártico y poli-L-glutámico

Las frecuencias de vibración $\nu_{as} (COO^-)$ y $\nu_s (COO^-)$ del ácido poli-L-glutámico en disolución (1580 y 1395 cm^{-1} respectivamente) se desplazan a 1550 y 1428 cm^{-1} cuando este polímero se une a los iones calcio para formar su sal correspondiente. Análogamente sucede cuando el ácido poli-L-glutámico es adsorbido sobre la hidroxil-apatita. En este caso, las frecuencias $\nu_{as} (COO^-)$ y $\nu_s (COO^-)$ adquieren unos valores muy próximos a los del poli-L-glutamato cálcico (tabla 10). Por consiguiente, parece lógico suponer que la interacción del ácido poli-L-glutámico con la hidroxil-apatita tiene lugar, al menos, a través de los grupos carboxilato. Que esto es así, parece confirmarse también con los espectros infrarrojos registrados a diferentes humedades relativas. Como se sabe, las cadenas polipeptídicas pueden adoptar estructuras tridimensionales bien definidas ó, lo que es lo mismo, estructuras secundarias. En la unidad repetitiva de la cadena polipeptídica, el grupo peptídico se considera como esencialmente plano y rígido (42), de manera que las estructuras secundarias se pueden caracterizar por los ángulos ψ y ϕ , que definen respectivamente, las rotaciones alrededor de los enlaces

$C_\alpha - C$ y $C_\alpha - N$:



Las transiciones conformacionales reversibles que tienen lugar entre las diferentes estructuras secundarias de este homopéptido cuando varía su humedad relativa (figura 40), implican unas variaciones de ψ y ϕ así como de las distancias entre las cadenas laterales. Si el polipéptido en cuestión está fijo a la superficie apatítica a través de las ramas laterales carboxílicas, cabe esperar que las variables geométricas anteriormente citadas no sufran una variación adecuada que permita las transiciones conformacionales anteriormente citadas para el polímero aislado.

En lo que respecta a los grupos peptídicos, la frecuencia amida I no sufre apreciable variación (5 cm^{-1}) al pasar de la disolución D_2O a la superficie apatítica. En el primer y segundo caso, estas frecuencias se sitúan respectivamente a 1645 y 1650 cm^{-1} . Este resultado parece indicar que no existe interacción apreciable entre los grupos peptídicos del ácido poli-L-glutámico y los cationes superficiales, ya que de lo contrario, se esperarían valores de las frecuencias amida I por debajo de 1630 cm^{-1} como ocurre en este trabajo con la poli-glicina y N-metil acetamida (Sección 5.3.1.) y en otros estudios en disolución (72-82). Esto es de esperar si se considera que la interacción de los grupos carboxilato laterales con los cationes superficiales es más fuerte que en el caso de la adsorción del grupo peptídico. La consecuencia de ello es que los centros

de adsorción catiónicos serán ocupados preferentemente por los grupos carboxilato.

Con el ácido poli-L-aspártico ocurren fenómenos similares a los citados para el polímero anterior. En efecto, cuando se adsorbe el ácido poli-L-aspártico sobre la superficie apatítica se hacen visibles las bandas correspondientes a los grupos carboxilato laterales, como la vibración de valencia asimétrica ν_{as} (COO^-), que aparece hacia 1560 cm^{-1} como un hombro sobre la banda de deformación del agua apatíticas (figura 36), y la ν_s (COO^-) situada a 1420 cm^{-1} . Esta última vibración aparece a frecuencias más bajas en disolución de D_2O (1395 cm^{-1}) como análogamente ocurría con el ácido poli-L-glutámico.

En ausencia de datos de espectroscopía Raman, es difícil atribuir una determinada estructura al polímero en la superficie apatítica, sobre todo distinguir una estructura α de otra desordenada (42). Así, cuando un polipéptido adopta una estructura ordenada tiene lugar un "splitting" entre las bandas amida I en el infrarrojo y Raman, siendo aquél menor para el caso de una estructura α y mayor para la β (42). Cuando la estructura es desordenada existe una coincidencia entre las frecuencias amida I en infrarrojo y Raman. En nuestro caso, el poder difusor débil de estos polímeros, la fluorescencia de la muestra y la pequeña proporción polímero-apatita no nos ha permitido obtener bandas medibles en el Raman. Pero debido a la ausencia de bandas de absorción infrarroja por debajo de 1630 cm^{-1} podemos descartar una estructura β para el ácido poli-L-glutámico adsorbido sobre la hidroxil-apatita. Por otra parte, la proximidad entre las fre

cuencias de adsorción infrarroja amida I del ácido poli-L-glutámico en D_2O y adsorbido en la superficie apatítica indica que en ésta persiste la estructura de la cadena polipeptídica existente en disolución acuosa. Finalmente, los resultados obtenidos por difracción de Rayos X a bajo ángulo parecen indicar también que la estructura periódica local de estos polímeros en disolución acuosa(35,56,90) persiste en la superficie apatítica.

La afinidad de los grupos carboxilato por los cationes apatíticos superficiales inducirá a que una considerable proporción de ellos se fije a la superficie apatítica como demuestra la no aparición de transiciones conformacionales del ácido poli-L-glutámico adsorbido sobre aquella y variando la humedad relativa de la muestra (figuras 37 , 38 y 39). Por la misma razón, los fragmentos helicoidales de estas macromoléculas tenderán a adaptarse paralelamente a la superficie del adsorbente. A la vista de estas consideraciones, resultaría estadísticamente improbable una separación simultánea de todos los grupos carboxilato sobre la superficie. Esta puede ser una de las razones por las cuales el ácido poli-L-glutámico resulta ser más eficaz en la disminución del crecimiento cristalino de la hidroxil-apatita que el monómero correspondiente (figura 56) (tabla 11). En efecto, las moléculas de adsorbato disminuyen el depósito de iones, procedentes de la disolución, sobre la superficie cristalina, dependiendo de la fracción de superficie cubierta por el adsorbato y de la movilidad de las moléculas de éste, desde la superficie a la disolución. A concentraciones de adsorbato de igual normalidad, y para la misma cantidad de adsorbente utilizado,

como en este caso, las fracciones de superficie que se podrían cubrir serían próximas cuando se adiciona ácido L-glutámico ó el homopolímero del mismo. Por lo tanto, el crecimiento cristalino disminuirá en presencia del polímero citado más que con el correspondiente monómero, ya que el primero, según se ha indicado anteriormente permanecerá más inmóvil en la superficie apatítica.

Estas diferencias de comportamiento frente a la cristalización también pueden estar determinadas por la estructura secundaria de las macromoléculas de adsorbato, como se discute más adelante.

6.2.2.- Influencia de la estructura de las macromoléculas estudiadas en el crecimiento de cristales de hidroxil-apatita.

Cuando se comparan los resultados de crecimiento cristalino de la hidroxil-apatita en presencia de ácido poli-L-glutámico ó ácido poliacrílico, con los obtenidos para el crecimiento de brushita, y a las mismas concentraciones normales de polímero en todos los casos, la influencia de cada una de estas sustancias orgánicas en la reducción del crecimiento cristalino, depende del fosfato sobre el que se adsorben. Así, mientras que el ácido poliacrílico reduce apreciablemente el crecimiento de la hidroxil-apatita, aproximándose en este aspecto al ácido poli-L-glutámico, en la brushita ejerce solo un ligero efecto (figuras 57 y 58). En efecto, tras una hora de incubación y de acuerdo con la ecuación (25), el ácido poli-L-glutámico reduce el crecimiento de cristales de hidroxil-apatita en un 60.8% y en un 50.0% el ácido poliacrílico. Sin embargo, en el caso de la brushita se obtiene, respectivamente, una reducción del 74.6%

y 5.4%. Dado que, según se ha indicado en las secciones 6.2.1.2. y 6.2.1.5, estas sustancias se unen mediante los grupos carboxilato a los cationes superficiales del adsorbente, será el acoplamiento entre las distancias interaniónicas de estos polímeros a las distancias intercatiónicas superficiales lo que determinará la mayor ó menor eficacia en la reducción del crecimiento cristalino del adsorbente.

En efecto, la morfología de los cristales de la brushita corresponde a un alargamiento según el eje b. Pero las distancias intercatiónicas en estas caras serán las que medien entre los cationes siguientes de la figura 63 : $\text{Ca (2) - Ca (6) = Ca (3) - Ca (5) = } \underline{c} = 6.83 \text{ \AA}$; $\text{Ca (2) - Ca (3) = Ca (6) - Ca (5) = } 10.35 \text{ \AA}$; $\text{Ca (1) - Ca (4) = } 6.01 \text{ \AA}$. Las distancias interaniónicas del ácido poliacrílico (tabla 2) son del orden de $3.18 - 3.42 \text{ \AA}$, es decir, considerablemente inferiores a las intercatiónicas referidas anteriormente. En el ácido poli-L-glutámico, sin embargo, los grupos carboxilato están separados por unas distancias de $6.00 - 7.54 \text{ \AA}$ (tabla 2) que son muy próximas a las que existen entre los cationes Ca (1) - Ca (4) (6.01 \AA) y Ca (2) - Ca (6) ó Ca (3) - Ca (5) (6.83 \AA) de la celdilla unidad de la brushita. Así se puede explicar que el ácido poli-L-glutámico sea más eficaz que el ácido poliacrílico en la reducción del crecimiento cristalino de este fosfato. En la hidroxil-apatita y, según se indicó en la sección 6.2.1.2., la mayor parte de la superficie corresponde a las caras cristalinas (1 0 0) con distancias intercatiónicas de 3.41 \AA . Estas son muy próximas a las existentes entre los grupos carboxilato del ácido poliacrílico ($3.18 - 3.42 \text{ \AA}$).

En este caso, se espera, pues, que la reducción del crecimiento cristallino de la hidroxil-apatita en presencia de este polímero sea apreciable, el 50% como indican nuestros resultados. El 60.8% obtenido para el ácido poli-L-glutámico, puede explicarse teniendo en cuenta varios factores: (a) que la flexibilidad de las ramas laterales de este polímero pueden permitir que las distancias interaniónicas se ajusten en cierta proporción a 3.41 \AA ; (b) las imperfecciones que, generalmente suelen existir en los cristales exponen a la superficie otras distancias intercatiónicas de la celdilla unidad de la hidroxil-apatita (Sección 6.2.1.2.) mayores que la citada, y más aún si se considera que la hidroxil-apatita utilizada no es estequiométrica y, por tanto, existen vacantes en las caras (1 0 0). Algunos trabajos de la literatura (57) indican que cuando el ácido poliacrílico está ionizado en disolución acuosa, adopta una estructura lineal relativamente rígida. Esto puede implicar una menor capacidad para envolver a un microcristal de apatita y, por consiguiente, una eficacia menor que el ácido poli-L-glutámico en la reducción de la cristalización.

El hecho de que los espaciados de los grupos carboxilato se adapten a los de los iones calcio de las superficies laterales de los cristales apatíticos, implicaría, en principio, un crecimiento de éstos preferentemente a lo largo del eje c cristalográfico. En efecto, en las figuras 56 , 55 y 50 se presentan muestras de hidroxil-apatita, y de este compuesto conteniendo ácido L-aspartico ó poli-L-aspartico adsorbido, respectivamente. De acuerdo con lo ex

puesto en la sección 6.2.1.2., el ácido aspártico posee mayor movilidad desde la superficie apatítica a la disolución que el homopolímero del mismo. Aunque el monómero puede fijarse a cualquier átomo superficial, la movilidad de aquél dejará crecer los cristales apatíticos independientemente de las moléculas de adsorbato. Por eso, la morfología cristalina de la muestra de hidroxil-apatita y la de ésta conteniendo ácido L-aspártico es prácticamente igual en ambos casos (figuras 55 y 56). Pero si el polímero permanece fijo (Sección 6.2.1.5.) en la superficie lateral de los cristales, éstos tendrán solamente la posibilidad de crecer más a lo largo del eje c. Así se puede explicar la estructura fibrosa que presentan los cristales apatíticos conteniendo el polímero adsorbido (figura 51). Esta estructura también podría resultar como consecuencia de que algunas moléculas de polímero presentes en la disolución actúen como microsustratos para la nucleación de cristales, que crecerían según la dirección de la celdilla unidad definida por el espaciado intercatiónico que se adapte a las distancias entre los grupos carboxilato del polímero. La estructura fibrosa, análoga a las anteriores, que también se obtiene para la hidroxil-apatita de los cálculos renales (figuras 47, 48 y 49) sugiere que la fracción orgánica de éstos se comporte similarmente a los polipéptidos estudiados con respecto a la cristalización apatítica. También apoya esta hipótesis la notable proporción de ácidos L-aspártico y L-glutámico hallada en el análisis de las fracciones orgánicas de los cálculos renales estudiados. Finalmente, las figuras 53 y 54 ponen de manifiesto la escasa influencia de la poli-glicina en la morfología de los cristales de hidroxil-apatita. Esta, en presencia del polipéptido citado muestra una estruc

tura similar a la que posee cuando está pura (figura 56) ó contiene ácido L-aspartico adsorbido (figura 55).

6.3.- Agregación de cristales de hidroxil-apatita no estequiométrica

Para que un polímero contribuya a la agregación de una suspensión de partículas, las moléculas del mismo deben ser adsorbidas en la superficie del sólido. La agregación puede, entonces, ocurrir por dos mecanismos básicamente diferentes (91): (a) mediante una reducción del potencial electrocinético de la superficie de las partículas a fin de permitir la agregación y cohesión a través de fuerzas de valencia residuales; (b) adsorción de moléculas del polímero sobre varias partículas, para de esta manera unir las entre sí.

La superficie de la hidroxil-apatita en contacto con una disolución de electrolito es polar y anfótera (7). Su carga depende de los iones constituyentes e incluso de los iones hidrógeno (92) (93). Su punto isoeléctrico, determinado por electroforesis es 7(92), pero algunas medidas potenciométricas sitúan dicho punto hacia 8(93). Dado que los experimentos de agregación de este trabajo se han realizado a pH 7.5, prácticamente, pues, en condiciones isoeléctricas respecto a la superficie apatítica, la agregación, en este caso, vendrá determinada por el mecanismo b), o sea, por la conexión de varias partículas a través de cada macromolécula utilizada. Dentro de este mecanismo habrá que considerar también la conformación de las moléculas en la superficie apatítica y la naturaleza de los grupos funcionales que se fijan en ésta. Así, de acuerdo con lo expuesto en

las secciones 6.2.1.2y 6.2.1.5, y con nuestros resultados espectroscópicos a diferentes humedades relativas (figuras 37 , 38 y 39), la afinidad de los grupos carboxilato por los iones calcio y el acomodamiento de las distancias interaniónicas a las intercatiónicas superficiales, sugiere que la mayor parte de cada macromolécula de homopéptido ácido adsorbido quede unida a la superficie apatítica y no existan, por lo tanto largos fragmentos moleculares en disolución susceptibles de unirse a otra partícula del sólido. Por otra parte, algunas de las numerosas cargas negativas que poseen estas macromoléculas pueden permanecer libres en la superficie de las partículas y originar la repulsión de éstas entre sí. A la vista de estas consideraciones, cabe esperar que los homopéptidos ácidos estudiados en este trabajo inhiban la agregación de partículas de hidroxil-apatita, como muestran nuestros resultados (figuras 59 y 60 , tabla 14). Fleisch y colaboradores (11) también han obtenido inhibición de la agregación de cristales de hidroxil-apatita mediante moléculas polianiónicas (citratos, EDTA, etc.).

La poli-glicina, sin embargo, se comporta de una manera distinta. En primer lugar, los únicos grupos carboxilato existentes son los situados en los extremos de sus cadenas. Una adsorción sobre la superficie apatítica sólo a través de estos grupos permitiría, en principio, la existencia de grandes fragmentos moleculares en disolución susceptibles de unirse a otras partículas. Evidentemente, y como muestran nuestros resultados espectroscópicos (figura 60), caben también las adsorciones de los grupos peptídicos que denderán a

fijarse en la superficie a lo largo de la molécula. Pero en este caso la interacción de estos grupos con la hidroxil-apatita (ión-dipolo) es más débil que la existente entre ésta y los grupos carboxilato (iónica), y por lo tanto, la movilidad de los fragmentos moleculares de la poli-glicina en la interfase sólido-líquido será mayor que cuando se trate de los grupos carboxilo de los homopéptidos ácidos. Por otra parte, la unión de varias partículas conteniendo cada una de ellas poli-glicina adsorbida, no vendrá influenciada por la repulsión eléctrica que existía con los homopéptidos ácidos. Por todo lo expuesto, cabe esperar que la poli-glicina aumente la agregación de cristales de hidroxil-apatita, tal como indican nuestros resultados (figuras 59 y 60 , tabla 14).

6.4.- Composición química de la fracción orgánica de los cálculos renales y su relación con los componentes cristalinos de aquéllos.

De la consideración de los resultados obtenidos en la tabla ³, se advierte, aparte de la mayor abundancia de los aminoácidos ácidos, una variación en la composición química de la fracción orgánica de los cálculos renales. A la vista de estos resultados cabe formular, en principio varias hipótesis:

- a) Que la composición química de cada fracción orgánica esté ligada a la composición cuali y cuantitativa de los cálculos renales respecto a sus componentes cristalinos
- b) Que la hipótesis anterior no sea cierta y la fracción orgánica de los cálculos renales se adsorba accidentalmente a las fases cristalinas de éstos
- c) Finalmente, una hipótesis que es la síntesis de las dos anteriores, es decir, que existan componentes de la fracción orgánica que se unan específicamente a determinadas fases cristalinas y otros que se adsorban accidentalmente

Según la hipótesis a) podría suceder que cada fase cristalina de los cálculos renales fuera nucleada por una proteína determinada y resutaran así fracciones orgánicas de composición total variable dependiendo de la proporción de los componentes cristalinos de los cálculos. Si esto sucediera, se cumplirían las ecuaciones matemáticas que se discuten a continuación:

Sea un cálculo constituido solo por dos fases cristalinas, como ocurre con los 1 y 2 de la tabla 3, cuyos componentes mayoritarios son extruvita y carbonato-apatita. Designemos por X_{ia} la fracción molar del aminoácido i dentro de la parte proteica de una macromolécula, P_a , que nuclee específicamente la fase cristalina a (apatítica); X_{ie} la fracción molar análoga del mismo aminoácido i dentro de la parte proteica de otra macromolécula, P_e , que nuclee específicamente la fase cristalina e (estruvita); X_i es la fracción molar del aminoácido i dentro del hidrolizado proteico de la fracción orgánica total de cada cálculo, que es conocida mediante el análisis cromatográfico de aminoácidos.

Si designamos por \bar{X}_{Pa} y \bar{X}_{Pe} las fracciones molares de las dos supuestas proteínas existentes en el cálculo en cuestión es evidente que se cumplirá la ecuación matemática:

$$X_{ia} \cdot \bar{X}_{Pa} + X_{ie} \cdot \bar{X}_{Pe} = \bar{X}_i \quad (30)$$

En la hipótesis de que cada proteína nuclee una fase cristalina determinada, habrá una relación constante entre ambas. Si estas relaciones son iguales para la carbonato-apatita y la estruvita, se puede escribir:

$$X_{ia} f_a + X_{ie} f_e = \bar{X}_i \quad (31)$$

donde f_a y f_e son las fracciones moleculares de cada fase cristalina determinadas por espectroscopía infrarroja (Sección 3.11.1.3.1).

Para otro cálculo constituido por las mismas fases cristalinas

nas que el anterior se tendrfa una ecuación análoga:

$$X_{ia}f'_a + X_{ie}f'_e = X' \quad (32)$$

Se obtendrá así un sistema de ecuaciones con dos incógnitas X_{ia} y X_{ie} . Evidentemente y para cada par de cálculos constituidos por estas dos fases, pueden construirse tantos sistemas como aminoácidos haya en las proteínas. Si, independientemente de los pares de cálculos que se consideren, se obtienen valores constantes para cada X_i , esto indicaría que la hipótesis a) sería cierta. Pero en nuestro caso, hemos obtenido algunos valores negativos para estas incógnitas, lo que se puede interpretar considerando varias posibilidades: que las constantes de proporcionalidad entre cada fase y su respectiva proteína no sea igual para todas las fases, o que sean ciertas las hipótesis b) ó c).

Por eso, para verificar la hipótesis a), el caso ideal sería disponer de varias series de cálculos, estando definida cada una de ellas por una misma composición química cuali y cuantitativa respecto a sus componentes cristalinos, y averiguando si la composición de las fracciones orgánicas permanece constante dentro de cada serie. Pero conseguir este caso ideal es difícil, sobre todo si se trata de cálculos con más de una fase cristalina.

Nosotros solo hemos podido disponer, en este aspecto, de una serie de dos cálculos prostáticos constituidos por carbonato-apatita, que en ambos casos posee unos grados de deficiencia muy similares. Como criterio de comparación de las fracciones orgánicas, hemos utili

zando los índices de diferencia, ID, respecto a la composición de aminoácidos (94). Este criterio consiste en hallar, por una parte, la diferencia entre las fracciones molares de cada aminoácido procedente de dos proteínas y, de otro lado, la suma de los valores absolutos de estas diferencias. Esta suma, multiplicada por 50 da el correspondiente índice de diferencia ID entre las dos proteínas comparadas. Dos proteínas que no tengan ningún aminoácido en común, darían un ID igual a 100, mientras que para otras dos con idéntica composición se obtendría un ID igual cero.

Los resultados obtenidos en la composición de las fracciones orgánicas estudiadas se incluyen en la tabla 16 , en la que se advierte que el índice de diferencia, ID, más pequeño, 8.6., corresponde a las fracciones orgánicas de los cálculos prostáticos estudiados. El citado valor, que es relativamente bajo, parece indicar que se trata de dos fracciones orgánicas similares en lo que a la composición de aminoácidos se refiere.

Es difícil buscar una conexión entre la composición de aminoácidos de estas fracciones orgánicas y las sustancias referidas en la literatura como posibles matrices en la urolitiasis, ya que dichas sustancias son muy variadas. Así, en algunos trabajos se indican a este respecto, bacterias muertas (95), uromucoide (2) y una "sustancia A" detectada inmunológicamente (96). La idea de algún tipo de mucoide o glicoproteína ha sido la más frecuente propuesta. Gottschalk (97) indicó que, respecto a la composición de aminoácidos, la proteína que más se aproxima a las fracciones orgánicas de los cálcu

Tabla 16.- Índices de diferencias (I.D.) correspondientes a las fracciones proteicas de los cálculos estudiados.

	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>α_1-glico- proteína</u>
1	0.0								
2	25.5	0.0							
3	28.4	26.4	0.0						
4	30.7	23.9	8.6	0.0					
5	18.8	21.2	21.0	23.8	0.0				
6	29.0	22.8	29.8	26.1	22.0	0.0			
7	35.2	18.2	30.7	29.0	25.0	16.9	0.0		
8	17.4	20.1	19.1	20.0	10.3	17.3	21.9	0.0	
α_1 -glicoproteína	14.9	20.4	28.1	27.4	25.7	28.9	33.3	21.9	0.0

los renales es la glicoproteína α_1 del suero. Otros autores (98) a partir de estudios de inmunoelectroforesis señalaron que esta mucoproteína junto con el uromucoide, se encuentra generalmente en los cálculos. Sin embargo, nuestros resultados de la tabla 16 indican que la composición en aminoácidos de las fracciones orgánicas estudiadas difieren notablemente de la que corresponde a la glicoproteína ácida α_1 .

7.- CONCLUSIONES

- 1) Se han analizado, por cromatografía de cambio iónico, los aminoácidos de las fracciones orgánicas de los siguientes cálculos:

a) Cálculos renales:

Dos constituidos por carbonato-apatita y estruvita; dos constituidos por carbonato-apatita, estruvita y oxalato cálcico monohidrato; uno de cistina y otro de oxalato cálcico monohidrato.

b) Cálculos prostáticos:

Dos constituidos por carbonato-apatita.

Los aminoácidos identificados en ambos tipos de cálculos son:

Lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutámico, prolina, glicina, alanina, cisteína, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina.

- 2) De acuerdo con los índices de diferencias obtenidos para las fracciones orgánicas de los cálculos estudiados, las más similares corresponden a los cálculos prostáticos (ID = 8.6), lo que indica que las fracciones orgánicas de éstos pueden influir de una manera relativamente específica en la formación de la carbonato-apatita.

En ningún cálculo, entre los estudiados en este trabajo, se ha obtenido un índice de diferencias indicativo de la existencia mayoritaria en todos los casos de la α_1 -glicoproteína del suero humano, en contra de lo que se ha sugerido en la literatura.

- 3) En todos los cálculos estudiados los aminoácidos más abundantes resultaron ser los ácidos aspártico y glutámico, cuya suma

de fracciones molares, dentro de la parte proteica de los cálculos, varía entre 0.20-0.35. Sobre esta base, y para estudiar la interacción de las cadenas laterales proteicas con la hidroxil-apatita, se han elegido como moléculas modelo de carácter ácido, los ácidos L-aspartico y L-glutámico y sus respectivos homopolímeros.

4) La influencia que ejercen los ácidos poli-L-glutámico y poliacrílico en la velocidad de precipitación de hidroxil-apatita y brushita, $\text{PO}_4\text{HCa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, puede correlacionarse con el acoplamiento de las distancias intercatiónicas de la sustancia precipitada a las interaniónicas de estas macromoléculas, calculadas teóricamente según el método descrito en este trabajo. Estos efectos sobre la velocidad de precipitación se pueden explicar sobre la base de la nucleación heterogénea de estos fosfatos sobre las macromoléculas citadas, las cuales actúan como microsubstratos de las cristalizaciones referidas.

5) Cuando los ácidos L-aspartico ó L-glutámico se adsorben sobre la hidroxil-apatita en las condiciones experimentales descritas en esta memoria, tiene lugar una sustitución de aniones apatíticos por aniones aspartato o glutamato. Las isotermas de adsorción obtenidas se ajustan a la de Langmuir. Esto último no sucede, en cambio, con el aminoácido básico L-arginina. Aunque este aminoácido sustituye a cationes apatíticos, muestra una menor afinidad por la hidroxil-apatita que los aminoácidos ácidos citados, debido probablen-

te a deslocalizaciones de las cargas de los iones de adsorbato y adsorbente.

- 6) El grupo peptídico de la N-metil acetamida se fija en la superficie apatítica a través del grupo carbonilo. Las frecuencias de absorción infrarroja amida I de esta sustancia y de la poli-L-glicina, indican una interacción amida-apatita ligeramente superior a las interacciones intermoleculares de esta amida en estado líquido. La frecuencia amida I de la N-metil acetamida sigue una relación lineal con respecto al cociente carga/radio de los cationes de apatitas de calcio, estroncio y bario, lo que indica que el grupo carbonilo se une preferentemente a los cationes superficiales apatíticos.
- 7) El ácido poli-L-glutámico adsorbido sobre la hidroxil-apatita no sufre transiciones conformacionales al variar la humedad relativa de la muestra como ocurre con las películas sólidas de este polímero. Esto, y la proximidad de las frecuencias de absorción infrarroja amida I de esta sustancia en disolución acuosa y adsorbida sobre la hidroxil-apatita, indica que este homopéptido se fija a la superficie apatítica preferentemente a través de los grupos carboxilato de las cadenas laterales.
- 8) En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, los ácidos L-aspártico y L-glutámico disminuyen el crecimiento de cristales de hidroxil-apatita. La incorporación de iones inorgánicos

a la red cristalina disminuye como consecuencia de la adsorción de aniones aspartato o glutamato según el modelo de adsorción de Langmuir. La menor eficacia de la L-arginina, respecto a los aminoácidos ácidos en la disminución del crecimiento de cristales apatíticos, puede explicarse como consecuencia de la menor afinidad de esta sustancia por la hidroxil-apatita. La interacción ion-dipolo que tiene lugar entre el adsorbente y la N-metil acetamida, sitúa a esta sustancia por debajo de los aminoácidos anteriores en la reducción del crecimiento de cristales apatíticos.

9) La baja probabilidad de que los grupos carboxilo laterales correspondientes a los ácidos poli-L-glutámico y poliacrílico se separen simultáneamente de la superficie del adsorbente, permite que estas macromoléculas sean más efectivas que los ácidos L-glutámico y L-aspartico en el retardo del crecimiento cristalino de la hidroxil-apatita. En este aspecto, el acoplamiento de las distancias intercarboxilo a las distancias intercatiónicas de la red cristalina juega un papel fundamental, como ocurre entre la hidroxil-apatita y las macromoléculas citadas. En la brushita, sin embargo, ese acoplamiento existe para el ácido poli-L-glutámico y no para el ácido poliacrílico, lo que puede justificar la diferencia de comportamiento de estas macromoléculas en el crecimiento cristalino de la brushita.

10) El ácido poli-L-glutámico y la poli-glicina inhiben e inducen respectivamente la agregación cristalina de la hidroxil-apatita.

- 11) Por microscopía electrónica de transmisión, se ha comprobado que la morfología cristalina de la hidroxil-apatita es modificada por la adsorción de los homopéptidos utilizados. Esta adsorción ocurre preferentemente sobre las caras (1 0 0). Asimismo, la morfología obtenida en este caso es muy similar a la de los cristales apatíticos extraídos de los cálculos renales, lo que parece indicar que en la fracción orgánica de éstos, los grupos carboxilo influyen notablemente en la cristalización apatítica.

8.- BIBLIOGRAFIA

- (1) W.H. Boyce y N.M. Sulkin. J. Clin. Invest. 35, 1067 (1956).
- (2) J.S. King y W.H. Boyce. Archives Biochem. Biophys. 82, 455 (1959).
- (3) J.S. King y W.H. Boyce. "High Molecular Weight Substances in human Urine". Ch.C. Thomas. Publisher Springfield. Illinois, U.S.A. (1963).
- (4) W.H. Boyce. Amer. J. Medicine. 45, 673 (1968).
- (5) R.S. Malek y W.H. Boyce. J. Urol. 117, 336 (1977).
- (6) J.K. Candlish. International J. Biochem. 2, 1 (1971).
- (7) V. Hlady y H. Fűredi-Milhofer. J. Colloid Interface Sci. 69, 460 (1979).
- (8) G. Bernardiy T. Kawasaki. Biochim. Biophys. Acta. 160, 301 (1968).
- (9) G. Bernardi. "Physico-chimie et Cristallographie des Apatites d'interet Biologique". C.N.R.S. Paris. 463 (1973).
- (10) M. Kresak, E.C. Moreno, R.T. Zahradnik y D.I. Hay. J. Colloid Interface Sci. 59, 283 (1977).
- (11) N.M. Hansen, R. Felix, S. Bisaz y H. Fleisch. Biochim. Biophys. Acta. 451, 549 (1976).
- (12) M. Santos y P.F. González-Díaz. Inorg. Chem. 16, 2131 (1977).
- (13) E.E. Berry. J. Inorg. Nucl. Chem. 29, 317 (1967).
- (14) H. Hofmann. Ber. Dent. Chem. Ges. 14, 2730 (1881).
- (15) M. Santos. Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Madrid. (1979).
- (16) S. Moore y W.H. Stein. J. Biol. Chem. 176, 367 (1948).
- (17) J.R. Spies. "Methods in Enzymology". vol. III. Eds. S. Colowich y N. Kaplan. Academic Press. New York & London (1951).

- (18) C.H. Fiske y J. Subbarow. J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
- (19) L. Winand. Ann. de Chim. 941 (1961).
- (20) P.F. González-Díaz y A. Hidalgo. Spectrochim. Acta. 32, 631 (1976).
- (21) R.A. Nyquist y R.O. Kagel. "Infrared Spectra of Inorganic Compounds". Academic Press. New York & London. (1971).
- (22) H.D. Keith, G. Giannoni y F.J. Padden. Biopolymers. 7, 775 (1969).
- (23) M. Fenton y A. Hiltner. Biopolymers. 17, 2309 (1978).
- (24) "The Aldrich Library of Infrared Spectra". Aldrich Chemical Co. Inc. Milwaukee. Wisconsin. (1975).
- (25) G.D. Fasman y K. Itoh. Biopolymers. 17, 1729 (1978).
- (26) A.C. Chapman y L.E. Thirwell. Spectrochim. Acta. 20, 937 (1964).
- (27) P.F. González-Díaz y M. Santos. J. Solid State Chem. 23, 265 (1978).
- (28) "Handbook of Chemistry and Physics". Chemical Rubber Publishing Co. Cleveland. Ohio, 1951 (1949).
- (29) N. Wright. Industr. Eng. Chem. Anal. Ed. 13, 1 (1941).
- (30) S. Brunauer, P.H. Emmet y E. J. Teller. J. Amer. Chem. Soc. 60, 309 (1938).
- (31) S. Bisaz, R. Felix, N.M. Hansen y H. Fleisch. Biochim. Biophys. Acta. 451, 560 (1976).
- (3) "Interatomic Distances". University Chemical Laboratory. Cambridge. (1972).
- (3) T. Shimanouchi y S.I. Mizushima. J. Chem. Phys. 23, 707 (1955).
- (3) E.W. Hughes y W.J. Moore. J. Amer. Chem. Soc. 71, 2618 (1949).

- (35) A.J. Hopfinger. "Conformational properties of macromolecules". Academic Press. New York & London. (1973).
- (36) J. Smolikova, A. Vitek y K. Blaha. Collect Czech. Chem. Commun. 38, 548 (1973).
- (37) J.F. Pearson y M.A. Slifkin. Spectrochim. Acta. 28A, 2403 (1972).
- (38) I. Langmuir. J. Amer. Chem. Soc. 40, 1361 (1918).
- (39) C.L. Angell, N. Sheppard, A. Yamaguchi, T. Shimanouchi, T. Miyazawa y S. Mizushima. Trans. Faraday Soc. 53, 589 (1957).
- (40) N. Tamiya y T. Shimanouchi. Spectrochim. Acta. 18, 895 (1962).
- (41) W.H. Moore y S. Krimm. Biopolymers, 15, 2439 (1976).
- (42) C. de Lozé, M.H. Baron y F. Fillaux. J. Chim. Phys. 75, 631 (1978).
- (43) T. Miyazawa y E.R. Blout. J. Amer. Chem. Soc. 83, 712 (1961).
- (44) T. Miyazawa. J. Chem. Phys. 32, 1647 (1960).
- (45) G.D. Fasman, H. Hoving y S.N. Timasheff. Biochemistry. 9, 3316 (1970).
- (46) H. Shiraishi, A. Hiltner y E. Baer. Biopolymers. 15, 1155 (1976).
- (47) H. Lenormant, A. Boudras y E.R. Blout. J. Amer. Chem. Soc. 80, 6191 (1958).
- (48) J.L. Koenig y B. Frushour. Biopolymers. 11, 1871 (1972).
- (49) H.D. Keith, F.J. Padden y G. Giannoni. J. Mol. Biol. 43, 423 (1969).
- (50) Yu.N. Chirgadze, O.V. Fedorov y N.P. Trushina. Biopolymers. 14, 679 (1957).

- (51) E.R. McCartney y S.E. Alexander. J. Colloid Interface Sci. 13, 383 (1958).
- (52) B.R. Smith y S.E. Alexander. J. Colloid Interface Sci. 34, 81 (1970).
- (53) J.D. Termine y A.S. Posner. Archives Biochem. Biophys. 140, 307 (1970).
- (54) J.D. Termine, R.A. Peckauskas y A.S. Posner. Archives Biochem. Biophys. 140, 318 (1970).
- (55) S. Sarig y F. Tartakovsky. Israel J. Chem. 12, 905 (1974).
- (56) M.L. Tiffany y S. Krimm. Biopolymers. 8, 347 (1969).
- (57) P.J. Kay, F.E. Treolar. Makromol. Chem. 175, 3207 (1974).
- (58) M.I. Kay, R.A. Young y A.S. Posner. Nature. 204, 1050 (1964).
- (59) C.A. Beevers. Acta Cryst. 11, 273 (1958).
- (60) N.A. Curry y D.W. Jones. J. Chem. Soc. (A) 23, 3725 (1971).
- (61) F.L. Binsbergen. "Progress in Solid State Chemistry" 8, 189, Pergamon Press. Oxford. New York (1973).
- (62) H. Naono. Bull. Chem. Soc. Japan. 40, 1104 (1967).
- (63) A. Van Hook. "Crystallization Theory and Practice". Reinhold Publ. Co. New York (1961).
- (64) M. Hardel. Hope-Seyler's Z. Physiol. Chem. 346, 224 (1966).
- (65) C. W. Davies y G.M. Waind. J. Chem. Soc. 3C1 (1950).
- (66) T. Miyazawa, T. Shimanouchi, S. Mizushima. J. Chem. Phys. 24, 408 (1956).
- (67) T. Miyazawa, T. Shimanouchi, S. Mizushima. J. Chem. Phys. 29, 611 (1958).

- (68) M. Rey-Lafon, M.T. Forel y C. Garrigou-Lagrange. *Spectrochim. Acta.* 29A, 471 (1973).
- (69) H. Pivcova, B. Schneider y J. Stokr. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 2215 (1965).
- (70) B. Schneider, A. Horvni, H. Pivcova y J. Honzl. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 2196 (1965).
- (71) A. Novak. *Structure and Bonding.* 18, 177 (1974).
- (72) A.F. Dioro, E. Lippincott y L. Mandelkern. *Nature.* 195, 1296 (1962).
- (73) A.J. Carty. *Canad. J. Chem.* 44, 1881 (1966).
- (74) I.S. Pereygin, S.V. Isosimova y Yu.M. Kessler. *Zh. Strukt. Khim.* 2, 390 (1968).
- (75) J.L. Wuepper y A.I. Popov. *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 4352 (1969).
- (76) R.D. Green. *Canad. J. Chem.* 47, 2407 (1969).
- (77) J.E. Pavlova, A.A. Fedorov, I.S. Pominov y L.B. Sokolov. *Zh. Priklad. Spektrosc.* 13, 544 (1970).
- (78) J.L. Wuepper y A.I. Popov. *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 1493 (1970).
- (79) C. Lassigne y P. Baine. *J. Phys. Chem.* 75, 3188 (1971).
- (80) M.H. Baron y C. de Lozé. *J. Chim. Phys. Physicochim. Biol.* 69, 1084 (1972).
- (81) M.H. Baron, C. de Lozé y G. Sagon. *J. Chim. Phys. Physicochim. Biol.* 70, 1509 (1973).
- (82) M.H. Baron, H. Jaeschke, R.M. Moravie, C. de Lozé y J. Corset. "Metal Ligand Interactions in Organic Chemistry and

Biochemistry". D. Reidel Publishing Company. Dordrecht.
Holland. 171 (1977).

- (83) R.C. Newman Jr, W.R. Woolfendon y V. Jonas. J. Phys. Chem. 73, 3177 (1969).
- (84) S.I. Mizushima. Adv. Protein Chem. 9, 299 (1954).
- (85) A. Lehninger. "Biochemistry". Worth Publishers Inc. (1971).
- (86) P.F. González-Díaz, M. Santos, J. Bellanato, A. Hidalgo y L. Cifuentes-Delatte. "Urolithiasis Research". Plenum Press. New York & London. 281 (1976).
- (87) H. Einspahr y C.E. Bugg. Acta Cryst. B30, 1037 (1974).
- (88) F.R. Eirich. J. Colloid Interface Sci. 58, 423 (1977).
- (89) G. Bernardi, M. Giro y C. Gaillard. Biochim. Biophys. Acta. 278, 409 (1972).
- (90) E. Patrone, E. Conio, A. Tealdi y S. Brighetti. Ric. Sci. 38, 1205 (1968).
- (91) A.S. Michaels. Ind. Eng. Chem. 46, 1485 (1954).
- (92) F.Z. Saleeb y P.L. De Bruyn. J. Electroanal. Chem. 37, 99 (1972).
- (93) L.C. Bell, A.M. Posner y J.P. Quirk. J. Colloid Interface Sci. 42, 250 (1973).
- (94) H. Metzger, M.B. Shapiro, J.E. Mosimann y J.E. Vinton. Nature. 219, 1166 (1968).
- (95) W.H. Boyce y F.K. Garvey. J. Urol. 76, 213 (1956).
- (96) J.S. King y W.H. Boyce. Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 579 (1963).
- (97) A. Gottschalk. "Glycoproteins". Elsevier. Amsterdam. (1966).
- (98) H.J. Keutel, G. Hermann y W. Licht. Clinica Chim. 5, 665 (1959).

